

# Ispitivanje uloge proteaze BACE1 u patogenezi rijetke nasljedne neurodegenerativne Niemann-Pickove bolesti tipa C

---

**Rastija, Ana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:378704>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-07**

*Repository / Repozitorij:*



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Ana Rastija

**ISPITIVANJE ULOGE PROTEAZE  
BACE1 U PATOGENEZI RIJETKE  
NASLJEDNE NEURODEGENERATIVNE  
NIEMANN-PICKOVE BOLESTI TIPA C**

DOKTORSKI RAD



Rijeka, 2023.



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU

Ana Rastija

**ISPITIVANJE ULOGE PROTEAZE  
BACE1 U PATOGENEZI RIJETKE  
NASLJEDNE NEURODEGENERATIVNE  
NIEMANN-PICKOVE BOLESTI TIPA C**

DOKTORSKI RAD

Mentor: dr.sc. Silva Katušić Hećimović

Rijeka, 2023.

UNIVERSITY OF RIJEKA  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

Ana Rastija

**ELUCIDATING THE ROLE OF A  
PROTEASE BACE1 IN THE  
PATHOGENESIS OF A RARE  
NEURODEGENERATIVE DISORDER  
NIEMANN-PICK TYPE C**

DOCTORAL THESIS

Mentor: dr.sc. Silva Katušić Hećimović

Rijeka, 2023.

Mentor rada: doc. dr. sc. Silva Katušić Hećimović, Institut Ruđer Bošković

Doktorski rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u/na \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Jelena Ban, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, Hrvatska
2. izv. prof. dr. sc. Ivana Munitić, Odjel za biotehnologiju, Rijeka, Hrvatska
3. izv. prof. dr. sc. Dubravka Švob Štrac, Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

## **Zahvale**

*Najiskrenije se želim zahvaliti svojoj mentorici dr. sc. Silvi Katušić Hećimović na pruženoj prilici, stručnom vodstvu, nesebičnoj pomoći i potpori tijekom izrade i pisanja ovog doktorskog rada. Bez vaših neiscrpnih ideja, motivacije i zalaganja ovaj rad ne bi postojao. Hvala Vam na prenesenom znanju i temeljima za daljnji znanstveno-istraživački rad.*

*Najiskrenije hvala svim članovima Laboratorija za istraživanje neurodegenerativnih bolesti.*

*Hvala Lei Vidatić, mag. biol. exp., na pomoći oko uzgoja miševa i primarnih kultura neurona.*

*Hvala dr. sc. Martini Deželjin na spremnosti da uvijek odgovori na sva moja pitanja i nedoumice.*

*Hvala Ivi Bazini, mag. biol. exp, i Kati Šešelja, mag. biol. exp, na svim zajedničkim trenutcima provedenim u laboratoriju i izvan njega. Hvala na svim ručkovima, šetnjama, razgovorima, smijehu, nesebičnosti, na velikoj podršci tijekom izrade i pisanja doktorskog rada. Uz vas ovo iskustvo je bilo zabavnije i veselije.*

*Zahvaljujem se svim članovima Zavoda za molekularnu medicinu a posebno Laboratoriju za mitohondrijsku bioenergetiku i dijabetes na koje sam uvijek mogla računati za bilo kakvu pomoć. Posebno hvala dr. sc. Sandri Sobočanec na pomoći oko statističke analize rezultata doktorskog rada. Veliko hvala najboljim tehničarkama Marini Marš i Ivi Pešun Međimorec na nesebičnosti te pomoći u svakom trenutku.*

*Hvala dr. sc. Luciji Lulić na svim ugodnim razgovorima i pomoći.*

*Veliko hvala Luciji Horvat, mag. bio. mol. na tehničkoj pomoći tijekom mikroskopiranja na konfokalnom mikroskopu.*

*Zahvaljujem djelatnicima Pogona laboratorijskih životinja dr. sc. Ranku Stojkoviću, Višnji Novalić, Maji Boranić i Goranu Golešu na uvijek dostupnoj pomoći oko miševa.*

*Hvala članovima povjerenstva za obranu ovog doktorskog rada: izv. prof. dr. sc. Jeleni Ban, izv. prof. dr. sc. Ivani Munitić, izv. prof. dr. sc. Dubravki Švob Štrac na svim prijedlozima i savjetima kao i gđi. Dairi Mejak na susretljivosti i pomoći oko administracije tijekom studija i u završnim fazama izrade doktorskog rada.*

*Hvala mojim prijateljima Ani, Dunji, Kristini, Luciji, Mateji, Nikolini, Teni i prijateljima molekularcima Anji, Adriani, Lei, Karlu, Mariji, Viktoriji na prijateljstvu, razumijevanju, pomoći i podršci.*

*I na kraju mojoj obitelji sestri Katarini, braći Marku i Josipu, a posebno mami i tati hvala na nesebičnoj pomoći, riječima ohrabrenja, vjeri, optimizmu, bezuvjetnoj ljubavi i podršci kroz cijelo školovanje i život. Bez vas ovo ne bi bilo moguće.*



## SAŽETAK

Bolest Niemann-Pick tipa C (NPC) je rijetka nasljedna neurodegenerativna bolest nakupljanja slobodnog kolesterola i drugih lipida uzrokovana mutacijama u genu *NPC1* ili *NPC2*, koja pokazuje niz patoloških sličnosti s kompleksnom Alzheimerovom bolesti (AB). Naša prethodna istraživanja su utvrdila povišeno djelovanje ključnog enzima u AB, proteaze BACE1, u NPC modelima. Stoga je cilj ovog doktorskog rada bio istražiti molekularnu pozadinu uočenog efekta te ispitati učinak inhibicije BACE1 na patološke karakteristike bolesti. Također, cilj je bio analizirati lipidom kako bi se utvrdile najranije promjene lipida odgovorne za različitu vulnerabilnost moždanih regija i disfunkciju endosoma u bolesti NPC. Korištene su primarne kulture neurona, kulture organotipskih rezova mozgov a te moždane regije hipokampus a i malog mozga miševa koji imaju spontanu mutaciju u genu *NPC1* te ne sintetiziraju proteina NPC1 (miševi NPC1) i miševa divljeg tipa (wt, od engl. *wild type*). U neuronima miševa NPC1 u odnosu na wt detektirana je povećana proteoliza supstrata BACE1-Sez6L i Sez6. Imunocitokemijska analiza je pokazala nakupljanje ovih supstrata u ranim endosomima NPC1 neurona. Promijenjen smještaj Sez6 i Sez6L u ranim endosomima je potvrđen i frakcioniranjem endolizosoma u moždanim regijama hipokampus a i malog mozga miševa NPC1. Interesantno, tretman inhibitorom BACE1 je djelomično popravio patološke značajke bolesti NPC, uključujući smanjenje nakupljanja Sez6 i Sez6L, smanjenje veličine vezikula ranih endosoma te smanjenje ukupne razine proteina tau u neuronima NPC1, kao i smanjenje neuroinflamacije (aktivacije astrocита i mikroglia) u kortiko-hipokamplanim rezovima miševa NPC1. Nadalje, analiza lipidoma je utvrdila da već u asimptomatskoj fazi bolesti postoji značajna razlika u distribuciji i razini određenih lipida u malom mozgu i hipokampusu, te u ranim endosomima miševa NPC1 u odnosu na wt. Ovo istraživanje je utvrdilo disfunkciju proteaze BACE1 i njenih supstrata te njihovu potencijalnu ulogu u patogenezi bolesti NPC. Uočene promjene sastava lipida moždanih regija i ranih endosoma mogu doprinijeti razvoju patoloških promjena u bolesti NPC.

**Ključne riječi:** BACE1, Niemann-Pick tip C, Alzheimerova bolest, lipidomika, endolizosomski transport, rijetke bolesti, neurodegeneracija, neuroinflamacija

## SUMMARY

Niemann-Pick disease type C (NPC) is a rare hereditary neurodegenerative disorder, caused by mutations in the *NPC1* or *NPC2* gene. It is characterised by accumulation of free cholesterol and other lipids and has a number of pathological similarities with complex Alzheimer's disease (AD). In our previous studies, increased activity of BACE1, the key enzyme of AD, was found in NPC mouse models. Therefore, the aim of this dissertation was to explore the molecular background of the observed effect and examine the effect of BACE1 inhibition on the pathological characteristics of the disease. In addition, the goal was to determine the earliest lipid changes responsible for the differences in brain region vulnerability and endosomal dysfunction in NPC disease by lipidome analysis. Primary neuronal cell cultures, organotypic brain slice cultures, and hippocampus and cerebellum of mice that have a spontaneous mutation in *NPC1* gene and do not synthesize the NPC1 protein (NPC1 mice) and wild type mice (wt) were used. NPC1 neurons showed increased proteolysis of BACE1 substrates- Sez6L and Sez6 compared with wt neurons. Immunocytochemical analysis demonstrated accumulation of the aforementioned substrates in early endosomes of NPC1 neurons. The altered localization of Sez6 and Sez6L in early endosomes was confirmed by endolysosome fractionation in the hippocampus and cerebellum of NPC1 mice. Interestingly, treatment with a BACE1 inhibitor partially ameliorated the pathological features of NPC disease, including reduction in the accumulation of Sez6 and Sez6L, reduction in the size of early endosome vesicles, reduction in total tau protein level in NPC1 neurons, and reduction in neuroinflammation (activation of astrocytes and microglia) in cortico-hippocampal brain slices from NPC1 mice. Lipidome analysis revealed that even in the asymptomatic phase of the disease, there are significant differences in the distribution and content of certain lipids between NPC1 and wt mice in the cerebellum and hippocampus, and in early endosomes. These studies provide evidence for a possible role of the BACE1 protease and its substrates in the pathogenesis of NPC disease. The observed changes in the lipid composition of brain regions and early endosomes may contribute to the development of the pathological features of NPC disease.

**Keywords:** BACE1, Niemann-Pick type C, Alzheimer's disease, lipidomics, endolysosomal transport, rare disease, neurodegeneration, neuroinflammation

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Bolest Niemann Pick tipa C (NPC) .....	1
1.1.1. Proteini NPC1 i NPC2.....	3
1.1.2. Kolesterol i interakcija proteina NPC1 i NPC2 .....	5
1.1.3. Nedostatak proteina NPC1/NPC2 .....	7
1.1.4. Dijagnoza i liječenje bolesti NPC .....	8
1.2. Alzheimerova bolest (AB).....	10
1.2.1. Mehanizam nastanka AB .....	12
1.2.1.1. Hipoteza amiloidne kaskade .....	12
1.2.1.2. Protein tau .....	14
1.2.1.3. Kolesterol u AB .....	15
1.3. Sličnosti i razlike između bolesti NPC i AB .....	16
1.4. Proteaza BACE1 .....	18
1.4.1. Proteaza BACE1 - središnji enzim u patogenezi AB.....	19
1.4.2. Terapijski potencijal proteaze BACE1 .....	20
1.4.3. Supstrati proteaze BACE1 - Sez6 obitelj proteina .....	21
1.4.4. BACE1 i bolest NPC- naša dosadašnja istraživanja .....	24
2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA .....	25
3. MATERIJALI I METODE .....	26
3.1. Uzgoj mišjeg modela bolesti NPC.....	26
3.1.1. Genotipizacija miševa .....	26
3.1.1.1. Izolacija DNA iz tkiva repa miševa .....	26
3.1.1.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR) .....	27
3.1.1.3. Elektroforeza u agaroznom gelu .....	28
3.2. Primarne kulture mišjih neurona .....	28
3.2.1. Priprema pribora i kemikalija za primarnu kulturu neurona .....	29
3.2.2. Disekcija tkiva.....	30
3.2.3. Obrada tkiva kore velikog mozga i hipokampusa .....	31
3.2.4. Održavanje kulture primarnih neurona .....	31
3.3. Kultura organotipskih rezova mišjih mozgova.....	32
3.3.1. Priprema pribora i kemikalija za kulturu organotipskih rezova mišjih mozgova	

3.3.2.	Diskecija tkiva mišjeg mozga .....	33
3.3.3.	Priprema organotipskih rezova mišjih mozгова za nasađivanje .....	33
3.3.4.	Održavanje organotipskih rezova mišjih mozгова u kulturi .....	34
3.4.	Tretman inhibitorom proteaze BACE1 .....	34
3.4.1.	Tretiranje primarnih kultura mišjih neurona inhibitorom proteaze BACE1 .....	34
3.4.2.	Tretiranje organotipskih rezova mišjih mozгова inhibitorom proteaze BACE1 34	
3.5.	Frakcioniranje endolizosomalnih vezikula mišjih moždanih regija .....	35
3.5.1.	Homogenizacija mišjih moždanih regija .....	35
3.5.2.	Izolacija ranih i kasnih endosoma centrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze .....	36
3.6.	Lipidomika .....	37
3.6.1.	Priprema homogenata moždanih regija za analizu lipidoma .....	37
3.6.2.	Priprema uzoraka ranih endosoma za analizu lipidoma .....	38
3.7.	Analiza razine proteina metodom Western blot .....	38
3.7.1.	Priprema staničnog lizata primarnih mišjih kortikalnih neurona .....	38
3.7.2.	Određivanje koncentracije proteina u staničnom lizatu .....	39
3.7.3.	Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) .....	39
3.7.4.	Prijenos proteina na membranu .....	41
3.7.5.	Bojanje membrane metodom Amido Black .....	41
3.7.6.	Vezanje antitijela na membranu .....	42
3.7.7.	Detekcija proteina na membrani kemiluminiscencijom .....	43
3.8.	Analiza smještaja proteina imunofluorescencijom .....	43
3.8.1.	Imunocitokemijska analiza .....	43
3.8.1.1.	Imunocitokemijska analiza primarnih mišjih neurona .....	44
3.8.2.	Imunohistokemija organotipskih rezova mišjih mozгова .....	45
3.9.	Analiza razine i unutarstaničnog nakupljanja kolesterola .....	45
3.9.1.	Određivanje razine kolesterola u endolizosomskim frakcijama moždanih regija 45	
3.9.2.	Imunocitokemijska analiza nakupljanja slobodnog neesterificiranog kolesterola u primarnim neuronima .....	46
3.10.	Kvantifikacija i statistička obrada podataka .....	47
4.	REZULTATI .....	48
4.1.	Karakterizacija primarnih kultura neurona mišjeg modela bolesti NPC1 .....	48
4.2.	Analiza supstrata proteaze BACE1 u primarnim kulturama neurona mišjeg modela bolesti NPC .....	51

4.2.1.	Analiza proteolize supstrata enzima BACE1 u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 i wt .....	52
4.2.2.	Analiza unutarstaničnog smještaja supstrata proteaze BACE1 u primarnim kulturama hipokampalnih neurona miševa NPC1 i wt .....	55
4.3.	Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 u primarnim kulturama neurona miševa NPC1 i wt	59
4.3.1.	Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na razinu supstrata enzima BACE1 u primarnim kulturama .....	59
4.3.2.	Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na smještaj supstrata Sez6L i Sez6 u primarnim kulturama hipokampalnih neurona miševa NPC1 i wt .....	64
4.3.3.	Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na smještaj i razinu proteina endolizosomalnog puta u primarnim kulturama neurona miševa NPC1 i wt .....	68
4.3.4.	Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na razinu i smještaj hiperfosforiliranog i ukupnog proteina tau u primarnim kulturama neurona miševa NPC1 i wt .....	73
4.4.	Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na ključne patološke karakteristike bolesti NPC u kulturi mišjih organotipskih rezova mozgova .....	77
4.5.	Analiza endolizosomskih frakcija izdvojenih iz moždanih regija 4 tjedna starih miševa wt i NPC1 .....	80
4.5.1.	Analiza raspodjele i razine biljega endolizosomalnog puta u razdvojenim endolizosomskim frakcijama malog mozga 4 tjedna starih miševa wt i NPC1 .....	82
4.5.2.	Analiza raspodjele i razine enzima BACE1 i njegovih supstrata u razdvojenim endolizosomskim frakcijama malog mozga 4 tjedna stari miševa NPC1 i wt.....	85
4.5.3.	Analiza raspodjele i razine biljega endolizosomalnog puta u razdvojenim endolizosomskim frakcijama hipokampusu 4 tjedna stari miševa NPC1 i wt.....	87
4.5.4.	Analiza raspodjele i razine enzima BACE1 i njegovih supstrata u razdvojenim endolizosomskim frakcijama hipokampusu 4 tjedna stari miševa NPC1 i wt.....	89
4.6.	Analiza lipidoma u moždanim regijama i u frakcijama ranih endosoma hipokampusu i malog mozga miševa NPC1 i wt .....	92
4.6.1.	Analiza lipidoma malog mozga i hipokampusu 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt	94
4.6.2.	Analiza lipida u frakcijama ranih endosoma malog mozga i hipokampusu 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt.....	101
5.	RASPRAVA .....	107
5.1.	Povećana proteoliza supstrata BACE1- Sez6, Sez6L i njihov promijenjeni smještaj u neuronima NPC1 .....	108
5.2.	Inhibicija proteaze BACE1 u primarnim kulturama neurona i u kulturi organotipskih rezova mozgova miševa NPC1 .....	110
5.3.	Raspodjela supstrata BACE1 u endolizosomskim frakcijama moždanih regija miševa NPC1 i wt .....	114

5.4. Raspodjela i razina lipinih razreda u moždanim regijama i u njihovim endosomskim frakcijama 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt .....	116
6. ZAKLJUČAK .....	120
7. LITERATURA.....	121
8. ILUSTRACIJE.....	142
9. ŽIVOTOPIS .....	149

## POPIS KRATICA

AB	Alzheimerova bolest
ADAM	skupina enzima $\alpha$ -sekretaza, od engl. <i>a disintegrin and metalloprotease</i>
AICD	unutarstanična domena proteina prekursora amiloida $\beta$ , od engl. <i>amyloid <math>\beta</math> precursor protein intracellular domain</i>
ApoE	apolipoprotein E
APP	protein prekursor amiloida $\beta$ , od engl. <i>amyloid <math>\beta</math> precursor protein</i>
A $\beta$	peptid amiloid $\beta$ , engl. <i>amyloid <math>\beta</math></i>
A $\beta$ 40	peptid amiloid $\beta$ od 40 aminokiselina
A $\beta$ 42	peptid amiloid $\beta$ od 42 aminokiseline
BACE1	$\beta$ -sekretaza, engl. <i><math>\beta</math>-site amyloid <math>\beta</math> precursor protein cleaving enzyme 1</i>
C3	inhibitor $\beta$ -sekretaze
CHO	stanice jajnika kineskog hrčka, od engl. <i>Chinese Hamster Ovary cells</i>
CTF-APP	C-terminalni odsječak proteina prekursora amiloida $\beta$ , od engl. <i>C-terminal fragment of amyloid <math>\beta</math> precursor protein</i>
CTF $\alpha$ /C83	C-terminalni odsječak proteina prekursora amiloida $\beta$ nastao cijepanjem $\alpha$ -sekretazom (od 83 aminokiseline)
CTF $\beta$ /C99	C-terminalni odsječak proteina prekursora amiloida $\beta$ nastao cijepanjem $\beta$ -sekretazom (od 99 aminokiselina)
EEA1	biljeg ranih endosoma, od engl. <i>early endosome antigen 1</i>
EOAD	rani oblik Alzheimerove bolesti, od engl. <i>early-onset Alzheimer's disease</i>
ER	endoplazmatski retikulum
FAD	nasljedni oblik Alzheimerove bolesti, od engl. <i>familial Alzheimer's disease</i>
flAPP	nepocijepani protein prekursor amiloida $\beta$ , od engl. <i>full-length</i>
flSez6	nepocijepani protein Sez6, od engl. <i>full-length</i>
flSez6L	nepocijepani protein Sez6L, od engl. <i>full-length</i>
LAMP1	biljeg lizosoma, od engl. <i>lysosomal associated membrane protein 1</i>
LDL	lipoprotein male gustoće, od engl. <i>low-density lipoprotein</i>

LOAD	“sporadični” ili kasni oblik Alzheimerove bolesti, engl. <i>late-onset Alzheimer's disease</i>
miševi NPC1	miševi bez proteina NPC1
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina, od engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>
NPC	bolest Niemann-Pick tipa C
NPC1	protein NPC1
NPC1- <i>null</i>	stanice bez proteina NPC1
NPC2	protein NPC2
P0-P1	postnatalni dan 0-1
PBS	fosfatni pufer, od engl. <i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom, od engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PNS	postnuklearni supernatant, od engl. <i>postnuclear supernatant</i>
PS1	presenilin 1
PS2	presenilin 2
PVDF	poliviniliden difluoridna membrana, engl. <i>polyvinylidene difluoride membrane</i>
Rab7	biljeg kasnih endosoma, od engl. <i>RAS-related protein 7A</i>
sAPP	izlučeni odsječak proteina prekursora amiloida $\beta$
sAPP $\alpha$	izlučeni odsječak proteina prekursora amiloida $\beta$ nastao cijepanjem $\alpha$ -sekretazom
sAPP $\beta$	izlučeni odsječak proteina prekursora amiloida $\beta$ nastao cijepanjem $\beta$ -sekretazom
Sez6	protein Sez6, od engl. <i>seizure protein 6</i>
sSez6	izlučeni odsječak proteina Sez6
Sez6L	protein Sez6L, od engl. <i>seizure 6-like protein</i>
sSez6L	izlučeni odsječak proteina Sez6L
wt	divlji tip, od engl. <i>wild-type</i>



# 1. UVOD

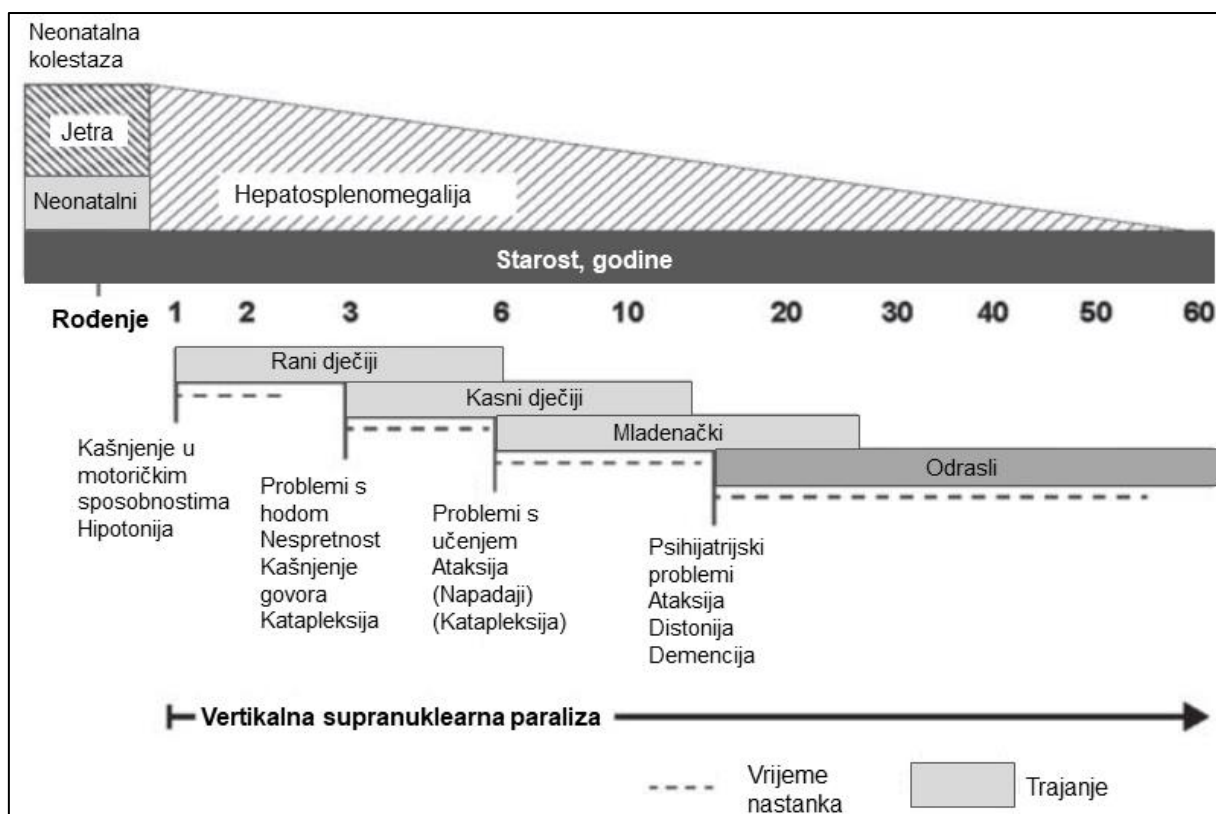
## 1.1. Bolest Niemann Pick tipa C (NPC)

Bolest Niemann Pick tipa C (NPC) je rijetki, nasljedni, neurodegenerativni poremećaj koji pripada skupini lizosomskih bolesti nakupljanja (Patterson i sur., 2012; Vanier, 2013). Nasljeđuje se autosomno recesivno, a javlja se u incidenciji 1:120000-150000 (Solomon i sur., 2005; Hammond i sur., 2019). U većini slučajeva bolest nastaje zbog mutacija u genu *NPC1* dok u samo 5% slučajeva uzrok mogu biti i mutacije u genu *NPC2*. Mutacije u ovim genima dovode do nakupljanja slobodnog kolesterola i drugih lipida u kasnim endosomima i lizosomima što naposljetku rezultira različitim visceralnim i neurološkim simptomima (Marschalek i sur., 2014; Citanović-Šojat i sur., 2014). Ova rijetka bolest dobila je ime po dvojici njemačkih liječnika. Pedijatar Albert Niemann, je 1914. g prvi opisao ovu bolest kao infantilni poremećaj s hepatosplenomegalijom i neurodegeneracijom, a patolog Ludwig Pick je 1927. g objavio rad u kojem je jasno razlučio bolest NPC od Gaucherove bolesti (Stern, 2014; Evans i Hendriksz, 2017; Cologna i Rosenhouse-Dantsker, 2019).

Simptomi bolesti su heterogeni i mogu se pojaviti u različitoj životnoj dobi od prenatalnog razdoblja pa do odrasle dobi (Slika 1.) (Vanier, 2010; Vanier, 2013; Citanović-Šojat i sur., 2014). Ova činjenica doprinosi otežanom i ranom prepoznavanju bolesti te njenoj nedovoljnoj dijagnosticiranosti. Klinički oblici bolesti se određuju prema dobi pojave prvih neuroloških simptoma jer vrijeme pojave neuroloških simptoma izrazito utječe na progresiju i prognozu bolesti (Patterson i sur., 2012; Vanier, 2013). Tako postoji: pre/perinatalni (do 3 mjeseca starosti), rani dječji (3 mjeseca do 2 godine), kasni dječji (2-6 godine), mladenački (6-15 godina) i odrasli (iznad 15 godina) oblik (Vanier, 2010; Patterson i sur., 2012; Pallottini i Pfrieger, 2020). Životni vijek pacijenata može biti od nekoliko dana do starijih od 60 godina, a većina pacijenata umire između 10. i 25. godine života (Citanović-Šojat i sur., 2014). Klinička slika ima širok spektar simptoma koji se odnose na visceralne, neurološke i psihijatrijske poremećaje (Citanović-Šojat i sur., 2014, Alobaidy, 2015; Pallottini i Pfrieger, 2020). Što se bolest javlja ranije, ona je agresivnija, a simptomi su teži i izraženiji (Evans i Hendriksz, 2017; Hammond i sur., 2019). Visceralni organi uključeni u bolest su jetra, slezena i pluća, a glavni visceralni simptom je hepatosplenomegalija (povećanje jetre i slezene), dok su najčešći neurološki simptomi cerebralna ataksija (gubitak koordinacije mišićnih pokreta), disfagija (poremećaj otežanog gutanja), disartrija (poremećaj artikulacije govora) i progresivna

demencija. Dosta česti i uobičajeni simptomi su i katapleksija (nagli gubitak mišićnog tonusa), epileptični napadaji i distonija (dugotrajne nevoljne mišićne kontrakcije), a psihijatrijski poremećaji su česti u kasnijim oblicima bolesti. Također, vertikalna supranuklearna paraliza pogleda je prisutna u većini slučajeva (Vanier i Millat 2003; Vanier, 2010; Evans i Hendriks, 2017; Hammond i sur., 2019; Pallottini i Pfrieger, 2020).

Neovisno o vremenu pojave prvih simptoma, svi oboljeli u konačnici razviju karakterističnu neuropatologiju. Neuropatološku sliku ove bolesti karakterizira promijenjena morfologija dendrita i aksona-stvaranje meganeurita i rast ektopičnih dendrita, neurodegeneracija primarno Purkinjeovih neurona u malom mozgu te kortikalnih neurona, hiperfosforilacija proteina tau i stvaranje neurofibrilarnih snopića, te izrazita neuroinflamacija tj. aktivacija astrocita i mikroglija stanica. Kako bolest napreduje, gubitak Purkinjeovih neurona postaje sve izraženiji. Razlog selektivne osjetljivosti Purkinjeovih neurona na neurodegeneraciju još uvijek nije razjašnjen (Saito i sur., 2002; Distl i sur., 2003; Pacheco i Lieberman, 2008; Vanier, 2010; Marschalek i sur., 2014; Platt i sur., 2016).



**Slika 1. Niemann-Pickova bolest tipa C pokazuje značajnu heterogenost s obzirom na dob javljanja bolesti i simptome.** Shematski prikaz različitih oblika bolesti NPC s naglaskom na vrstu i dob pojave prvih neuroloških simptoma. Heterogenost bolesti NPC doprinosi njenom otežanom i ranom prepoznavanju te njenoj nedovoljnoj dijagnosticiranosti (preuzeto i prilagođeno prema Patterson i sur., 2012).

### 1.1.1. Proteini NPC1 i NPC2

Geni *NPC1* i *NPC2* su snažno očuvani kroz evoluciju i konstitutivno su eksprimirani u većini tkiva sisavaca što ukazuje na njihovu važnu ulogu u organizmu. Do danas je zabilježeno više od 470 mutacija u genu *NPC1* i oko 27 mutacija u genu *NPC2* (Hammond i sur., 2019).

Gen *NPC1* nalazi se na 18 kromosomu (18q11-q12) i njegovom ekspresijom nastaje veliki transmembranski glikoprotein od 1258 aminokiseline (170–190 kDa) (Citanović-Šojat i sur., 2014). Protein NPC1 se sastoji od 13 transmembranskih domena, 3 luminalne domene, a primarno je smješten u membranama kasnih endosoma i lizosoma (Pacheco i Lieberman, 2008; Shammas i sur., 2019). Pet transmembranskih domena u proteinu NPC1 predstavljaju tzv. domene osjetljive na sterole (SSD, od engl. *sterol sensing domains*). Pokazano je da proteinska

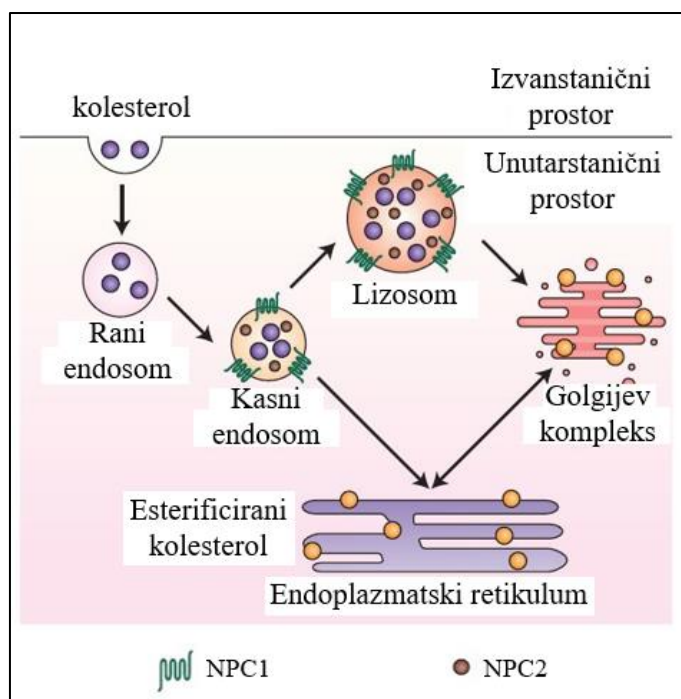
sekvenca ovih domena pokazuje homologiju sa senzorskim domenama za sterole drugih proteina koji prepoznaju kolesterol kao što su protein SCAP (od engl. *SREBP cleavage activating protein*) i 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktaza, enzim koji regulira brzinu biosinteze kolesterola u organizmu (Stroch i Xu, 2009; Trinh i sur., 2018; Bräuer i sur., 2019). Istraživanja su pokazala da protein NPC1 ima važnu ulogu u unutarstaničnom prijenosu kolesterola i da njegov nedostatak u stanicama dovodi do blokade u recikliranju kolesterola (Scott i Ioannou, 2004; Pacheco i Lieberman, 2008). Dodatno, otkriveno je da NPC1 ima ulogu i u retrogradnom transportu različitih lipida, ali i proteina od kasnih endosoma do *trans*-Golgijeve mreže (Vanier i Millat 2003; Shammas i sur., 2019). Osim ovih uloga u staničnom transportu lipida i proteina pokazano je da je protein NPC1 potreban za ulazak virusa Ebole i Marburg virusa u stanicu, gdje služi kao intraluminalni receptor za internalizaciju virusa (Li i sur., 2016; Shammas i sur., 2019).

Gen *NPC2* se nalazi na 14. kromosomu i prvi put je opisan kao gen *HE1* koji kodira za glavni sekretorni protein prisutan u ljudskom epididimusu (Stroch i Xu, 2009). Protein NPC2 je mali, topivi glikoprotein od 132 aminokiseline (25kDa) koji se primarno nalazi u lumenu lizosoma i eksprimiran je u većini tkiva sisavaca (Pacheco i Lieberman, 2008; Hammond i sur., 2019). Sastoji se od četiri ECR regije (od engl. *evolutionary constrained regions*): A, B, C i D. Regija ECR D je uključena u vezanje kolesterola. Daljnje studije su pokazale da ova regija sadrži hidrofobni džep za vezanje kolesterola što je dodatno potvrđeno kristalizacijskim studijama (Vanier i Millat 2003; Vanier i Millat, 2004; Pacheco i Lieberman, 2008; Hammond i sur., 2019). *In vitro* istraživanja su utvrdila da NPC2 brzo veže i prenosi kolesterol od donorske do akceptorske membrane izravnom interakcijom NPC2-membrana putem takozvanog mehanizma sudara (kolizijskog mehanizma). Premda se vezanje kolesterola i prijenos događa i u neutralnom pH okruženju pokazano je da je prijenos puno brži u kiselom okruženju poput onog u endolizosomalnim organelama (Bräuer i sur., 2019; Cologna i Rosenhouse-Dantsker, 2019). Iako je NPC2 visoko eksprimiran u epididimisu, gdje ima posebnu ulogu u stvaranju spermija, detektiran je i u različitim tkivima gdje sudjeluje u prijenosu sterola, te u različitim izlučevinama kao što su mlijeko, žuč i plazma što ukazuje na njegovu široku ulogu u organizmu (Vanier i Millat, 2004; Infante i sur., 2008; Stroch i Xu, 2009).

### 1.1.2. Kolesterol i interakcija proteina NPC1 i NPC2

Kolesterol ima važnu ulogu u različitim staničnim funkcijama poput reguliranja fizičkih svojstava stanične membrane, rasta, proliferacije. Također, kolesterol služi kao signalna molekula u raznim biokemijskim staničnim putevima i kao prekursor biološki aktivnih molekula poput steroidnih hormona i žučnih kiselina. Stoga je normalna homeostaza kolesterola neophodna za funkcionalni integritet stanice (Stroch i Xu, 2009; Cologna i Rosenhouse-Dantsker, 2019; Bräuer i sur., 2019)

Razina kolesterola u stanici je strogo regulirana višestrukim putevima koji uključuju *de novo* sintezu, unos, recikliranje te oslobađanje kolesterola (Subramanian i Balch, 2008; Zhang i Liu, 2015; Cologna i Rosenhouse-Dantsker, 2019). Unutarstanični kolesterol može nastati u stanici *de novo* sintezom ili ga stanica može unijeti procesom endocitoze preko LDL (od engl. *low-density lipoprotein*) receptora u obliku LDL čestica (Bräuer i sur., 2019; Meng i sur., 2020). LDL čestice prenose esterificirani kolesterol do kasnih endosoma i lizosoma u čijem se lumenu kolesterol esteri hidroliziraju u slobodni kolesterol pomoću enzima kisele lipaze (Subramanian i Balch, 2008; Vanier, 2010; Bräuer i sur., 2019; Pfeffer, 2019). Proteini NPC1 i NPC2 imaju ulogu u prijenosu slobodnog kolesterola iz kasnih endosoma / lizosoma u ostale dijelove stanice poput *trans*-Golgijeve mreže, stanične membrane ili endoplazmatskog retikuluma (ER) koji je odgovoran za regulaciju sinteze i esterifikacije kolesterola tj. za održavanje homeostaze staničnog kolesterola (Ikonen, 2006; Pacheco i Lieberman, 2008; Vanier, 2010; Ye i DeBose-Boyd, 2011). Brojna istraživanja na staničnim i životinjskim modelima su pokazala da ova dva proteina vrlo vjerojatno zajednički, tj. kooperativno djeluju u ovom procesu. Naime, miševi koji imaju mutacije u oba gena, i *NPC1* i *NPC2*, pokazuju sličan fenotip bolesti NPC kao i miševi koji imaju mutacije u samo jednom od ova dva gena, što je potvrdilo da ova dva proteina sudjeluju zajedno u istome putu (Vanier i Millat 2003; Infante i sur., 2008; Pacheco i Lieberman, 2008; Dixit i sur., 2011; Cologna i Rosenhouse-Dantsker, 2019).



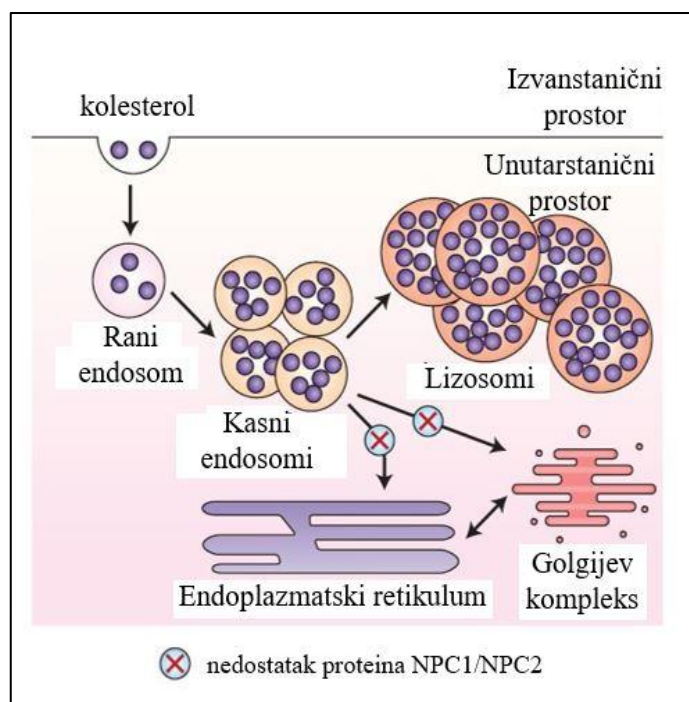
**Slika 2. Transport kolesterola u stanici.** Kolesterol ulazi u stanicu endocitozom nakon što se lipoproteinska čestica LDL veže na LDL-receptor. Zatim se LDL čestica prenosi do ranih endosoma koji sazrijevaju do kasnih endosoma i lizosoma gdje se hidrolizira, a proteini NPC1 i NPC2 imaju ulogu u prijenosu neesterificiranog kolesterola i drugih lipida iz kasnih endosoma/lizosoma prema *trans*-Golgijevoj mreži, endoplazmatskom retikulumu i ostalim staničnim dijelovima. (preuzeto i prilagođeno po Pacheco i Lieberman, 2008).

Točan mehanizam prijenosa kolesterola iz kasnih endosoma i lizosoma pomoću proteina NPC1 i NPC2 još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, no brojna istraživanja podupiru hipotezu o „primopredajnom“ modelu u kojem protein NPC2 unutar lumena lizosoma veže kolesterol te ga zatim predaje proteinu NPC1, koji se nalazi u membrani (Trinh i sur., 2018; Dixit i sur., 2011; Pfeffer, 2016). Na koji se način odvija daljnji prijenos kolesterola od membrane lizosoma do ostalih dijelova stanice/organela još uvijek nije poznato. Pretpostavlja se da NPC1 „detektira“ povišene razine kolesterola u membrani kasnih endosoma/lizosoma te signalizira pupanje membrane lizosoma i tako prijenos tereta/kolesterola do odredišta unutar stanice (Bräuer i sur., 2019). Također, lizosomi mogu membranskim kontaktima ostvariti izravan fizički kontakt s *trans*-Golgijevom mrežom, mitohondrijima, peroksisomim i ER-om, čime se omogućuje prijenos kolesterola u stanici (Meng i sur., 2020).

### 1.1.3. Nedostatak proteina NPC1/NPC2

Mutacije u genu *NPC1* ili *NPC2* te posljedični gubitak funkcije proteina NPC1 ili NPC2 dovode do poremećaja u transportu kolesterola i drugih lipida što rezultira njihovim zastojem (engl. „*lipid traffic jam*“) i nakupljanjem u kasnim endosomima i lizosomima, te njihovom pogrešnom lokacijom i nedostatkom na ciljanom mjestu djelovanja unutar stanice (Vanier i Millat 2003; Marschalek i sur., 2014). Zbog nakupljanja kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima smanjuje se njegova koncentracija u ER-u što rezultira povećanim unosom i *de novo* sintezom kolesterola, te zaustavljanjem esterifikacije i u konačnici poremećenom homeostazom kolesterola u stanici (Pentchev i sur., 1986). Nakupljanje lipida je tkivno specifično i razlikuje se između mozga i ostalih organa. U perifernim organima poput jetre, slezene, primarno se nakupljaju slobodni kolesterol, sfingomijelin, bis-monoacilglicerol fosfat (BMP, od engl. *Bis (Monoacylglycero) Phosphate*; također nazvan LBPA – *lysobisphosphatidic acid*), te razni glikolipidi. U mozgu dolazi do nakupljanja glukozilceramida, laktozilceramida i značajne akumulacije glikosfingolipida posebice gangliozida GM2 i GM3 (Rodriguez-Lafrasse i sur., 1994; Walkley i Vanier, 2009; Peake i Vance, 2010; Dixit i sur., 2011; Alobaidy, 2015).

Mozak je kolesterolom najbogatiji organ, čak 20-25% ukupnog kolesterola u tijelu otpada na mozak, stoga poremećaji u endolizosomalnom putu, transportu kolesterola i drugih lipida pokreću kaskadu patoloških procesa kao što su manjak kalcija, oksidativni stres, disfunkcija neurona, neuroinflamaciju i naposljetku smrt neurona (Dietschy i Turley, 2004; Hammond i sur., 2019). Baudry i suradnici (2003) su u svojim istraživanjima na mišjem modelu bolesti NPC pokazali da gubitak funkcije proteina NPC1/2 dovodi i do poremećaja glija stanica-astrocita i mikroglia stanica te do izlučivanja toksičnih citokina, što za posljedicu ima dodatnu aktivaciju astrocita i pogoršanje same patologije. Kolesterol u mozgu primarno potječe od endogeno sintetiziranog kolesterola (Morell i Jurevics, 1996). Stoga je rasvjetljavanje uloge proteina NPC1/NPC2 važno za bolje razumijevanje patofiziologije ove, ali i drugih neurodegenerativnih bolesti u kojima su uočene promjene metabolizma kolesterola.



**Slika 3. Nedostatak proteina NPC1 ili NPC2 uzrokuje nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima.** Zbog nedostatka proteina NPC1 ili NPC2 dolazi do nakupljanja kolesterola i ostalih lipida u kasnim endosomima/lizosomima što uzrokuje smanjenu razinu kolesterola u staničnoj membrani i ostalim dijelovima stanice poput *trans*-Golgijeve mreže i endoplazmatskog retikuluma (ER-a). Smanjena razina kolesterola u ER-u uzrokuje povećanu *de novo* sintezu kolesterola unutar stanice (preuzeto i prilagođeno po Pacheco i Lieberman, 2008).

#### 1.1.4. Dijagnoza i liječenje bolesti NPC

Dijagnoza bolesti NPC često je dugotrajan proces, s vjerojatnošću postavljanja pogrešne dijagnoze, koja se događa najviše zbog heterogenosti i nespecifičnosti kliničkih simptoma koji se javljaju u različitoj životnoj dobi (Citanović-Šojat i sur., 2014; Pallottini i Pfrieger, 2020). Specifični dijagnostički test za ovu bolest je tzv. filipin test. Ovim testom analizira se nakupljanje slobodnog kolesterola u primarnim kulturama fibroblasta pacijenata, koji su obojeni filipinom. Filipin je spoj koji se veže na slobodni kolesterol i fluorescira što omogućuje njegovu vizualizaciju u stanici. Nakon pozitivnog filipin testa, najčešće se provodi i sekvencioniranje i analiza DNA kako bi se utvrdile točne mutacije u *NPC1* ili *NPC2* genu (Alobaidy, 2015; Pallottini i Pfrieger, 2020). Iako je filipin test primarni dijagnostički test bolesti NPC sve više se u dijagnostičke svrhe koriste novootkriveni biomarkeri u plazmi poput oksisterola, TCA (od engl. *trihydroxycholanolic acid*) i TGC (od engl. *trihydroxycholanolic acid*)



*glycinate*). Ovi dijagnostički testovi su brži i manje invazivni od filipin testa jer nije potrebna biopsija kože pacijenata (Patterson, 2020; Jiang i Ory, 2021).

Trenutno za bolest NPC ne postoji lijek, a terapija je većinom orijentirana na ublažavanje simptoma bolesti. Do sada jedini specifični licencirani lijek je miglustat, koji je u Europskoj uniji odobren 2009. godine (Davidson i sur., 2009; Patterson i sur., 2012; Alobaidy, 2015; Pallottini i Pfrieger, 2020). Miglustat je iminošećer koji inhibira enzim glukozilceramid sintazu koja je odgovorna za prvi korak u sintezi većine glikosfingolipida. Pokazano je da miglustat ima pozitivan učinak na smanjenje nedostatka transporta lipida, neurotoksično nakupljanje glukozilceramida, laktozilceramida, gangliozida GM2 i GM3 u mozgu, te uzrokuje odgađanje progresije neuroloških simptoma. Međutim, pokazano je da miglustat nema utjecaja na visceralne simptome i da kao posljedicu može imati neželjene učinke na gastrointestinalni sustav (Patterson i sur., 2012; Alobaidy, 2015; Shammam i sur., 2019). Također, pokazano je da kombinacija prehrane s niskom razinom kolesterola i lijekova za snižavanje kolesterola ima pozitivan učinak na nakupljanje kolesterola u jetri pacijenata, ali nema pozitivni učinak na razinu kolesterola u mozgu NPC pacijenata (Alobaidy, 2015).

Osim miglustata, ciklodekstrin je spoj koji se intenzivno istražuje kao potencijalni lijek za bolest NPC (Hastings i sur., 2019). Ciklodekstrin veže kolesterol i rutinski se koristi za moduliranje razine staničnog kolesterola u staničnim kulturama (Liu, 2012). Istraživanja na *NPCI*<sup>-/-</sup> miševima su pokazala da ciklodekstrin pozitivno utječe na smanjenje razine kolesterola, sfingomijelina, glikosfingolipida i sfingozina u jetri i slezeni kao i na smanjenje razine kolesterola, gangliozida i sfingozina u mozgu (Patterson i sur., 2012). Davidson i suradnici su pokazali da kronični tretman 7 dana starih *NPCI*<sup>-/-</sup> miševa ciklodekstrinom, svaki drugi dan tijekom dva tjedna, dovodi do značajnog poboljšanja motoričkih funkcija, smanjenja nakupljanja lipida i smanjenja neurodegeneracije u malom mozgu te u konačnici do produljenja životnog vijeka (Davidson i sur., 2009). Provedena istraživanja na mačjem modelu bolesti NPC su pokazala da izravan unos ciklodekstrina u mozak rezultira odgođenom patologijom u malom mozgu, smanjenjem gubitka Purkinjeovih neurona i smanjenjem nakupljanja kolesterola i sfingolipida, za više od godinu dana (Vite i sur., 2015). No, tretman ciklodekstrinom u mačjem modelu, i kod zdravih i kod *NPCI*<sup>-/-</sup> mačaka, je ukazao na moguće oštećenje perifernog slušnog puta (Liu, 2012; Vite i sur., 2015). Provedena eksperimentalna studija na pacijentima s NPC je pokazala da ciklodekstrin pozitivno utječe na neke sistemske i neurološke simptome bolesti, no potrebna su još dodatna istraživanja kako bi se utvrdila točna učinkovita doza i interval

doziranja. Trenutno su u tijeku dva klinička ispitivanja za procjenu sigurnosti, farmakokinetike i farmakodinamike ciklodekstrina (Hastings i sur., 2019).

Lijekovi koji se danas koriste za modifikaciju bolesti, ne pokazuju pozitivne učinke na mozak i na periferne organe (Hastings i sur., 2019). Sama heterogena priroda ove bolesti otežava pronalazak lijeka i pouzdanih biomarkera za točnu dijagnozu i praćenje tijeka bolesti. Sve se više smatra da je incidencija ove bolesti puno veća nego što se prvotno mislilo. Stoga postoji potreba za podizanjem svijesti o ovoj bolesti, novim dijagnostičkim testovima za rano otkrivanje i prikladnim, optimalnim terapijama (Patterson, 2020; Jiang i Ory, 2021).

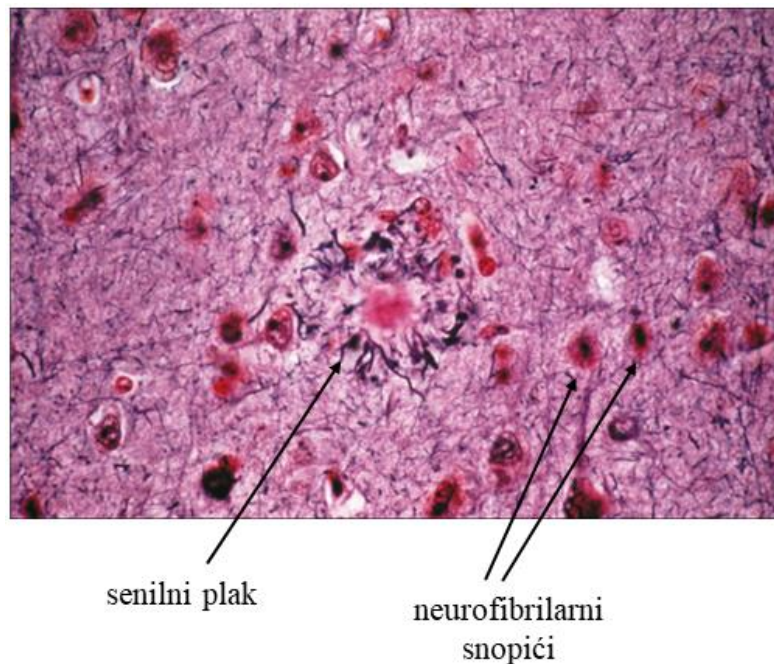
## 1.2. Alzheimerova bolest (AB)

Alzheimerova bolest (AB) je progresivna, neurodegenerativna bolest mozga koja uzrokuje poremećaj u strukturi i funkciji mozga. Najučestaliji je oblik demencije te čini 60-70% svih slučajeva demencije (Blennow i sur., 2006; Korolev, 2014). Uzrok nastanka ove bolesti još uvijek nije razjašnjen i predmet je brojnih istraživanja. Iako je starenje najveći rizični čimbenik, i vjerojatnost razvoja AB eksponencijalno raste s dobi, epidemiološke i genetičke studije su pokazale da ova kompleksna bolest nastaje kao posljedica djelovanja određenih genetičkih i okolišnih čimbenika (Blennow i sur., 2006; Holtzman i sur., 2011; Querfurth i Laferla, 2018).

Postoje dva oblika Alzheimerove bolesti: nasljedni i sporadični. Nasljedni oblik AB (FAD, od engl. *Familiar Alzheimer's disease*) se prenosi autosomno dominantno i javlja se prije 65. godine života zbog čega se naziva i ranim oblikom (EOAD, od engl. *early-onset Alzheimer's disease*). Uzrok nastanka ovog oblika su mutacije u genima za protein prekursora peptida amiloid beta (APP, od engl. *amyloid  $\beta$  precursor protein*), te preseniln 1 (PS1) i preseniln 2 (PS2) (Cole i Vassar 2007; Zhang i sur., 2020). Sporadični oblik je najčešći oblik AB na koji otpada 95% svih AB slučajeva. Javlja se nakon 65. godine života te se još naziva i kasni oblik AB (LOAD, od engl. *late-onset Alzheimer's disease*). Uzrok nastanka ovog oblika je i dalje nepoznat. Iako se smatralo da je ovaj oblik bolesti sporadičan, po čemu je i dobio ime, novija genetska istraživanja ukazuju da je ovaj oblik vjerojatno posljedica zajedničkog djelovanja određenih gena i rizičnih čimbenika (Gatz i sur., 2006; Cole i Vassar, 2007; Malnar i sur., 2009; Korolev, 2014). Glavni genetički rizični čimbenik za razvoj sporadičnog oblika AB je polimorfizam u genu za apolipoprotein E (APOE). Dvije neovisne studije iz 1993. g. ukazale

su na povezanost alela  $\epsilon 4$  APOE i sporadičnog oblika AB (St George-Hyslop i Petit, 2005; Blennow i sur., 2006; Korolev, 2014). Heterozigoti za APOE alel  $\epsilon 4$  imaju 3 puta veći rizik za razvoj AB dok se kod homozigota taj rizik povećava čak 15 puta. Također alel  $\epsilon 4$  utječe i na raniju pojavu simptoma bolesti i to svaka kopija za 10-ak godina (St George-Hyslop i Petit, 2005; Blennow i sur., 2006; Malnar i sur., 2009).

Na staničnoj razini u mozgu AB je karakterizirana progresivnim odumiranjem kortikalnih neurona, posebice piramidalnih stanica, što dovodi do kognitivnih simptoma- gubitka pamćenja i progresivnog gubitka intelektualnih sposobnosti (Korolev, 2014). Glavna neuropatološka obilježja AB su senilni plakovi i neurofibrilarni snopići. Senilni plakovi su izvanstanične nakupine agregiranog peptida amiloid beta ( $A\beta$ ), dok se neurofibrilarni snopići nalaze unutar stanice i nakupine su hiperfosforiliranog proteina tau (Slika 4.) (Burns, 2009; Zhang i sur., 2020).



**Slika 4.** Prikaz neuropatoloških obilježja AB: senilnih plakova- izvanstaničnih nakupina peptida  $A\beta$  i neurofibrilarnih snopića - unutarstaničnih nakupina hiperfosforiliranog proteina tau (preuzeto i prilagođeno prema Burns, 2009).

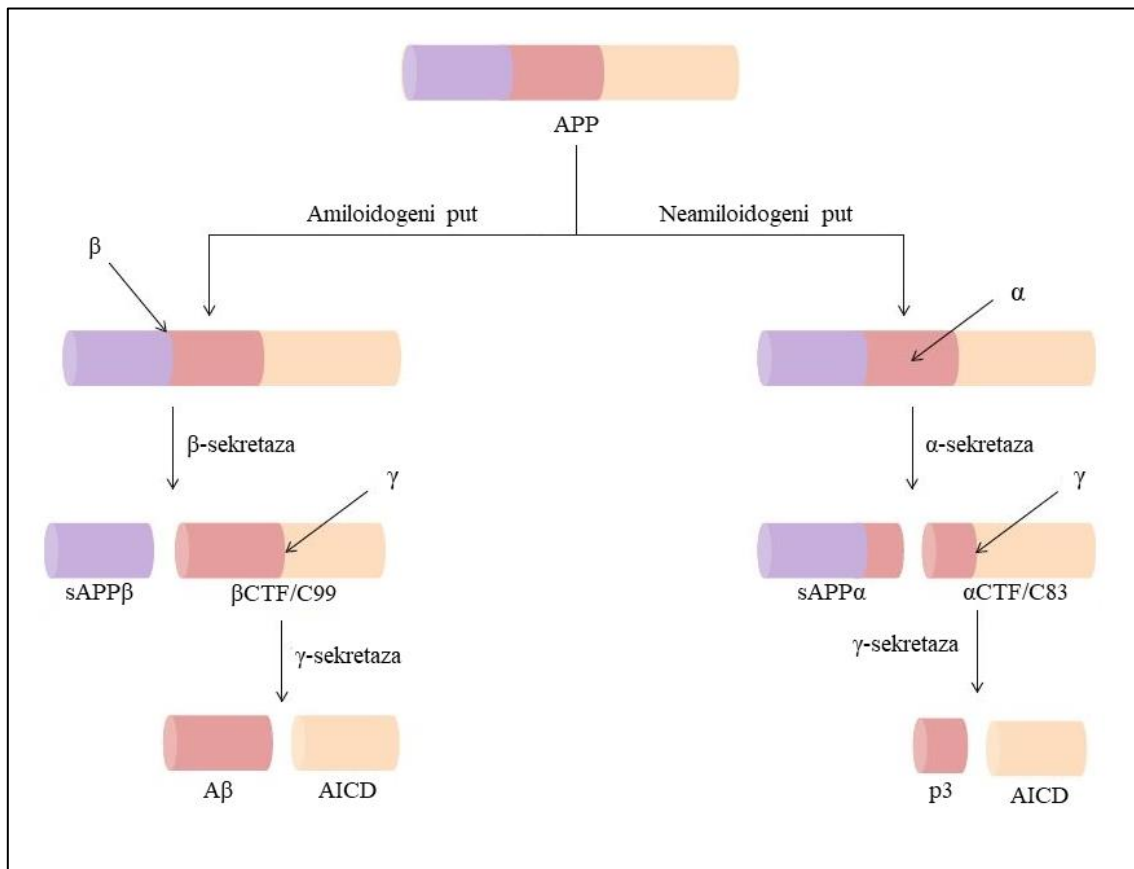
## 1.2.1. Mehanizam nastanka AB

### 1.2.1.1. Hipoteza amiloidne kaskade

Hipoteza amiloidne kaskade smatra se vrlo vjerojatnim mehanizmom nastanka AB. Ova hipoteza pretpostavlja da je promijenjen metabolizam tj. razina peptida A $\beta$  prvi, početni korak koji pokreće kaskadu događaja koji u konačnici rezultiraju patološkim i kliničkim simptomima AB (Hardy i Higgins, 1992; Hardy i Selkoe, 2002; St George-Hyslop i Petit, 2005; Blennow i sur., 2006; Querfurth i Laferla, 2018). Peptidi A $\beta$  nastaju sekvencijalnim cijepanjem proteina APP. APP je transmembranski protein koji sadrži kratku C-terminalnu citoplazmatsku domenu i veliku N-terminalnu ektodomena i cijepa se dvama različitim proteolitičkim putevima:  $\alpha$ -sekretaznim (neamiloidogeni put) ili  $\beta$ -sekretaznim (amiloidogeni put).

U neamiloidogenom putu APP se prvo cijepa na staničnoj membrani  $\alpha$ -sekretazom (ADAM 10, od engl. *A Disintegrin And Metalloprotease Domain protein*) unutar A $\beta$  sekvence, čime se onemogućuje nastanak peptida A $\beta$ . Cijepanjem  $\alpha$ -sekretazom nastaje topivi N-terminalni odsječak- sAPP $\alpha$  (od engl. *soluble APP $\alpha$* ), koji se izlučuje iz stanice i manji membranski C-terminalni odsječak CTF $\alpha$ /C83 (od engl. *C-Terminal Fragment*) koji je supstrat  $\gamma$ -sekretaze, membranskog kompleksa koji se sastoji od četiri proteina: nikastrina, proteina PEN-2 i APH-1 te presenilina (PS1 ili PS2) u aktivnom mjestu kompleksa. Cijepanjem CTF $\alpha$ /C83  $\gamma$ -sekretazom nastaje topivi odsječak p3 i C-terminalni peptid AICD (od engl. *APP-IntraCellular Domain*) (Malnar i sur., 2009; Haass i sur., 2012; Zhang i sur., 2020). Amiloidogeni put, koji se odvija primarno u kiselom okruženju u endosomima, započinje cijepanjem APP-a  $\beta$ -sekretazom (BACE1, od engl.  *$\beta$ -site APP Cleaving Enzyme*). Cijepanjem nastaje topivi N-terminalni odsječak sAPP $\beta$  (od engl. *soluble APP $\beta$* ), koji se izlučuje iz stanice i manji membranski C-terminalni odsječak- CTF $\beta$ /C99. CTF $\beta$ /C99 se dalje cijepa  $\gamma$ -sekretazom i kao rezultat cijepanja oslobađa se peptid A $\beta$  i nastaje C-terminalni peptid AICD. Ovisno o poziciji cijepanja  $\gamma$ -sekretaze nastaju peptidi A $\beta$  različite veličine. Najčešći oblik je A $\beta$ 40 (dug 40 aminokiselina) koji je uglavnom topljiv, dok je drugi najčešći A $\beta$ 42 toksičniji, skloniji agregiranju i stvaranju senilnih plakova. U normalnim uvjetima peptid A $\beta$  se brzo razgrađuje u lizosomima i uklanja iz stanice. Međutim tijekom starenja ili u patološkim stanjima poput AB, metabolička razgradnja se smanjuje i dolazi do neravnoteže između stvaranja i razgradnje peptida što dovodi do nakupljanja peptida A $\beta$  i njegovog agregiranja prvo u manje pa veće oligomere te zatim u fibrile koje su neurotoksične, uzrokuju neuronalnu disfunkciju i smrt

neurona te potiču hiperfosforilaciju proteina tau (Walsh i sur., 2002; Kametani i Hasegawa, 2018; Long i Holtzman, 2019; Zhang i sur., 2020).



**Slika 5. Shematski prikaz procesiranja prekursora proteina amiloid-β (APP).** APP se može cijepati prvo β-sekretazom u amiloidogenom putu ili α-sekretazom u neamiloidogenom putu. Kao rezultat cijepanja nastaju topljivi odsječci sAPPβ ili sAPPα te C-terminalni odsječci CTFβ/C99 ili CTFα/C83. C-terminalni odsječci CTFα/C83 ili CTFβ/C99 su supstrati γ sekretaze čijim cijepanjem nastaje AICD (engl. *APP Intracellular domain*) te amiloidogeni peptid amiloid-β (Aβ) ili neamiloidogeni peptid p3 (preuzeto i prilagođeno prema Uddin i sur., 2020).

U prilog amiloidogenoj hipotezi, kao dominantnoj hipotezi nastanka AB, govore i činjenice da se mutacije koje uzrokuju nasljedni oblik AB nalaze u genima za protein APP i za katalitičke podjedinice γ sekretaze-PS1 ili PS2, ključnim komponentama stvaranja peptida Aβ. Nadalje, osobe sa Downovim sindromom koje imaju trisomiju 21. kromosoma, na kojem se nalazi gen *APP*, razvijaju amiloidne plakove i patologiju sličnu AB u ranijoj životnoj dobi. Smatra se da je razlog tome što osobe sa Down sindromom imaju povećanu količinu proteina APP (uslijed tri kopije umjesto dvije kopije *APP* gena) i posljedično povećanu razinu peptida

A $\beta$  u odnosu na zdrave osobe od samog začeća/rođenja (Hardy i Selkoe, 2002; Blennow i sur., 2006; Kametani i Hasegawa, 2018). Također, nedavna istraživanja su pokazala da nakupljanje peptida A $\beta$  u mozgu počinje 10-20 godina prije početka prvih simptoma/demencije, što ukazuje da akumulacija A $\beta$  u određenom vremenskom periodu (kao npr. prilikom starenja) ima ključnu ulogu u patogenezi AB (Hardy i Selkoe, 2002; Rutten i Steinbusch, 2013; Vassar, 2014).

#### 1.2.1.2. Protein tau

Protein tau je topivi protein koji se nalazi u aksonima živčanih stanica gdje se veže na mikrotubule i ima ulogu u stvaranju i stabilnosti mikrotubula, te u vezikularnom transportu. Mikrotubuli u aksonima igraju važnu ulogu u strukturi neurona, aksonalnom transportu i sinaptičkoj plastičnosti (Querfurth i Laferla, 2018; Long i Holtzman, 2019). U AB dolazi do hiperfosforilacije proteina tau. Brojna istraživanja su ukazala da bi taj događaj mogao biti jedan od primarnih okidača neurodegeneracije u AB. Hiperfosforilacija proteina tau smanjuje afinitet proteina tau za mikrotubule što uzrokuje nestabilnost mikrotubula i njihovu razgradnju te nakupljanje hiperfosforiliranog proteina tau u obliku neurofibrilarnih snopića i neuropilnih niti unutar neurona. Neurofibrilni snopići i neuropilne niti građene su od sparenih helikalnih filamenata (PHFs, od engl. *paired helical filaments*) sastavljenih od netopivog, hiperfosforiliranog proteina tau (PHF-tau) (Malnar i sur., 2009; Long i Holtzman, 2019). Ove promjene dovode do poremećenog transporta unutar aksona te oslabljene funkcije i aktivnosti sinapsa što uzrokuje gubitak sinapsi i smrt neurona (Blennow i sur., 2006; Querfurth i Laferla, 2018; García-Morales i sur., 2021). Za razliku od patologije peptida A $\beta$ , stadij patologije proteina tau bolje korelira s progresijom kognitivnih poremećaja te gubitkom neurona i kliničkim simptomima AB. Međutim, iako je nakupljanje proteina tau jedna od glavnih značajki AB, prisutno je i u drugim srodnim neurodegenerativnim bolestima, koje se zajedno nazivaju taupatijama (Braak i Braak, 1991). Mehanizam nastanka AB se intenzivno istražuje, a nedavno je pokazano da je za nastanak kognitivnog poremećaja ključna zajednička prisutnost patoloških procesa i tau proteina i peptida A $\beta$  (García-Morales i sur., 2021).

### 1.2.1.3. Kolesterol u AB

Osim peptida A $\beta$  i proteina tau pokazano je da značajnu ulogu u razvoju AB ima poremećeni metabolizam kolesterola (Burns i sur., 2003). Brojne nezavisne studije su utvrdile da je *APOE*  $\epsilon$ 4 alel glavni genetički rizični čimbenik za razvoj AB. ApoE ima glavnu ulogu u prijenosu kolesterola u mozgu. Kod čovjeka postoje tri varijante alela *APOE*,  $\epsilon$ 2,  $\epsilon$ 3,  $\epsilon$ 4. Dok se *APOE*  $\epsilon$ 4 povezuje s povećanim rizikom za razvoj Alzheimerove bolesti, genotip *APOE*  $\epsilon$ 2 smatra se protektivnim (Malnar i sur., 2014; Kametani i Hasegawa, 2018). Mehanizam kojim *APOE*  $\epsilon$ 4 povećava rizik za AB još nije u potpunosti razjašnjen. Otkriveno je da se ApoE  $\epsilon$ 4 zajedno s A $\beta$  nakuplja u amiloidnim plakovima (William Rebeck i sur., 1993). Također, pokazano je da ApoE ima ulogu u metabolizmu A $\beta$ , a da varijanta  $\epsilon$ 4 ima manji afinitet za peptide A $\beta$  što dovodi do smanjenog uklanjanja A $\beta$  iz stanica (LaDu i sur., 1994). Brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja su pokazala da promjene u homeostazi kolesterola i endocitnom transportu utječu na proteolitičku razgradnju proteina APP i nastanak peptida A $\beta$  (Burns i sur., 2006). Studije na transgeničnim mišjim modelima AB su otkrile da povećan unos kolesterola uzrokuje povećano nakupljanje peptida A $\beta$  i odsječaka CTF te smanjenje razine fragmenta sAPP $\alpha$  u mozgu transgeničnih miševa, dok je suprotan učinak uočen nakon terapija lijekovima za snižavanje kolesterola (Refolo i sur., 2000; Refolo i sur., 2001; Burns i sur., 2003). Zamijećeno je i da razina kolesterola neizravno utječe na aktivnost sekretaza koje procesiraju APP. Egzogeno dodani kolesterol lizatima humanog moždanog tkiva pospješio je aktivnost  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaze, a tretman primarnih kultura mišjih neurona kolesterolom je rezultirao povećanim izlučivanjem peptida A $\beta$ 42 (Feringa i van der Kant, 2021). Također više nezavisnih studija je otkrilo da povećane razine kolesterola potiču kolokalizaciju APP i BACE1 u istim staničnim odjeljcima i procesiranje APP-a amiloidogenim putem (Cordy i sur., 2003; Eehalt i sur., 2003; Cossec i sur., 2010; Marquer i sur., 2011). Sukladno tome, pokazano je da niže razine kolesterola inhibiraju procesiranje APP-a  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretazom, dok potiču procesiranje APP-a neamiloidogenim putem (Feringa i van der Kant, 2021). Također, pretpostavlja se da su promjene u metabolizmu kolesterola i njegovo nakupljanje povezani i sa stvaranjem neurofibrilarnih snopića (Distl i sur., 2003). Promjene u metabolizmu kolesterola utječu na razinu fosforiliranog tau proteina u neuronima dobivenim iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica (iPSC, od engl. *induced pluripotent stem cells*) pacijenata s obiteljskim oblikom AB, dok su lijekovi koji snižavaju kolesterol pozitivno utjecali na smanjenje razine fosforiliranog tau (van der Kant i sur., 2019).

### 1.3. Sličnosti i razlike između bolesti NPC i AB

AB i bolest NPC su progresivne neurodegenerativne bolesti sa različitom epidemiologijom i etiologijom. Dok je AB česta i kompleksna bolest, složene etiologije koja uključuje genetske čimbenike i rizične čimbenike iz okoline, bolest NPC je rijetka monogenska autosomno recesivna bolest. Međutim, zanimljivo je da bolest NPC pokazuje niz sličnosti s AB, uključujući disfunkciju endolizosomalnog puta, povećanu razinu CTF $\beta$ /C99 i peptida A $\beta$ , promijenjeni metabolizam kolesterola i ApoE  $\epsilon$ 4 te patologiju tau proteina, što upućuje da bi ove dvije bolesti mogle dijeliti neke zajedničke molekularne stanične mehanizme.

Promijenjeni metabolizam proteina APP jedna je od glavnih karakteristika AB koja je primijećena i u bolesti NPC. Brojna istraživanja su pokazala da u staničnom modelu bolesti NPC kao i u mozgovima *NPC1*<sup>-/-</sup> miševa dolazi do nakupljanja peptida A $\beta$  i CTF $\beta$ /C99 odsječaka (Yamazaki i sur., 2001; Burns i sur., 2003; Jin i sur., 2004; Kodam i sur., 2010). Također, Mattsson i sur. su u likvoru NPC pacijenata primijetili povećanu razinu peptida A $\beta$  (Mattsson i sur., 2012). Senilni plakovi karakteristični za AB nisu pronađeni u pacijentima s NPC vjerojatno zbog brzog razvoja patologije i nedostatka vremena tj. procesa starenja koji je prisutan u AB (Yamazaki i sur., 2001). Međutim, pronađeni su difuzni plakovi u nekoliko NPC pacijenata koji su bili homozigoti za alel *APOE*  $\epsilon$ 4 (Auer i sur., 1995; Saito i sur., 2002).

Nadalje, u bolesti NPC primijećena je disfunkcija endolizosomalnog puta. Pokazano je da uslijed nedostatka funkcionalnog proteina NPC1 i posljedičnog nakupljanja kolesterola dolazi do povećane kolokalizacije APP-a i enzima BACE1 u ranim endosomima što rezultira povećanim cijepanjem APP-a enzimom BACE1 i nakupljanjem odsječaka CTF $\beta$ /C99 i peptida A $\beta$  u kasnim i u ranim endosomima (Yamazaki i sur., 2001; Jin i sur., 2004; Malnar i sur., 2010). Dodatno, u preparatima moždanog tkiva NPC pacijenata uočeno je da se peptidi A $\beta$  i CTF $\beta$ /C99 nakupljaju u abnormalno povećanim endosomima kakvi su primijećeni i u AB (Jin i sur., 2004).

Kod većine juvenilnih i odraslih NPC pacijenata pronađeni su neurofibrilarni snopići, bogati PHF-tau filamentima, za koje je pokazano da su strukturno i imunološki slični onima u AB ukazujući na sličnost u mehanizmu nastanka tau patologije u bolesti NPC i u AB (Auer i sur., 1995; Bu i sur., 2002; Distl i sur., 2003).

*APOE*  $\epsilon$ 4 je najvažniji genetički rizični faktor za razvoj AB, a istraživanja su pokazala da genotip *APOE* ima ulogu i u bolesti NPC. Alel *APOE*  $\epsilon$ 4 povezan je s ranijom pojavom i



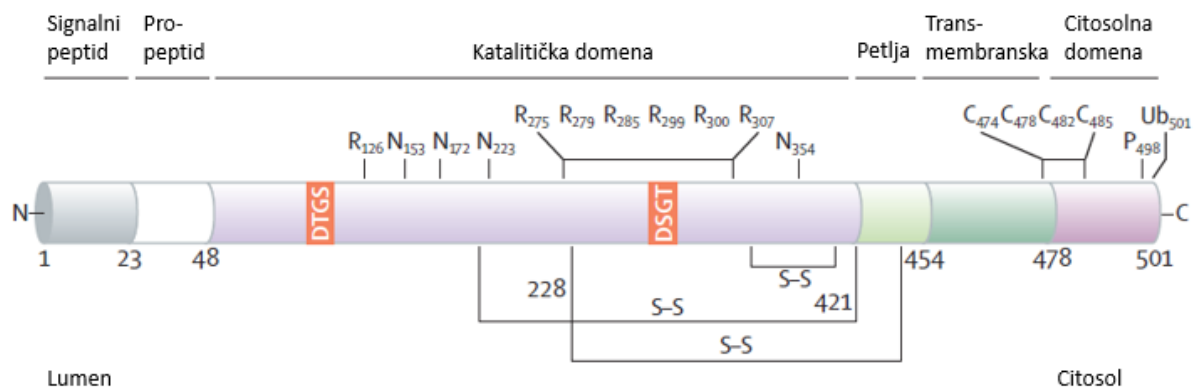
bržom progresijom bolesti NPC, kao i AB. Pokazano je da u *APOE*  $\epsilon$ 4-pozitivnih NPC pacijenata dolazi do ranije pojave tau patologije, tj. do ranijeg stvaranja i većeg broja neurofibrilarnih snopića (Saito i sur., 2002). Kod nosioca alela  $\epsilon$ 2 gena *APOE*, za koji je pokazano da smanjuje rizik od AB, uočena je kasnija pojava bolesti NPC (Fu i sur., 2012). Ovi podatci su pokazali da *APOE*  $\epsilon$ 4, osim što je rizični čimbenik za razvoj AB, utječe na raniju pojavu i bržu progresiju bolesti NPC.

Još jedna od zajedničkih karakteristika ove dvije bolesti je neuroinflamacija. Poznato je da je u bolesti NPC neuroinflamacija zamijećena prije pojave drugih neuropatoloških karakteristika bolesti, dok se kod AB neuroinflamacija javlja kao odgovor na već započete patološke procese (Platt i sur., 2016). Osim što bolest NPC pokazuje niz sličnosti s AB, uočene su i promjene NPC1 mRNA i proteina u mišjim modelima AB i pacijentima s AB. U mozgovima oboljelih od AB utvrđene su promjene u ekspresiji tj. razini mRNA i proteina NPC1 (Ginsberg i sur., 2011). Gubitak jednog alela *NPC1* u mišjem modelu AB je rezultirao povećanim nakupljanjem peptida A $\beta$  i povećanim stvaranjem plakova. Također, pokazano je i obrnuto, da povećana ekspresija proteina APP (Maulik i sur., 2012) kao i delecija gena *APP* u *NPC1*<sup>-/-</sup> mišu pogoršava patologiju bolesti NPC (Nunes i sur., 2011).

Unatoč tome što NPC i AB dijele brojne sličnosti, ove dvije bolesti pokazuju i jasne neuropatološke razlike. Dok u AB dolazi do neurodegeneracije primarno u hipokampusu i moždanoj kori, a neuroni malog mozga se čine očuvani, u bolesti NPC je opisana izrazita neurodegeneracija Purkinjeovih neurona u malom mozgu, a nasuprot tome neurodegeneracija u hipokampusu nije zamijećena (Ko i sur., 2005; Malnar i sur., 2014). Ipak, iako se isprva smatralo da hipokampus nije zahvaćen u bolesti NPC, pretpostavlja se da bi i on mogao biti zahvaćen, ali da je zbog brže progresije bolesti i njenog javljanja već u djece hipokampus samo prividno „zaštićen“. Istraživanja koja su usmjerena na proučavanje razlika regionalno specifične neurodegeneracije između AB i bolesti NPC su važna jer mogu razjasniti te otkriti protektivne i/ili rizične mehanizme neurodegeneracije kao i ključne čimbenike ovog procesa u ovim, ali i u drugim neurodegenerativnim bolestima. Također ova istraživanja doprinose i boljem razumijevanju molekularne patogeneze ovih bolesti te pronalasku učinkovitih terapija.

#### 1.4. Proteaza BACE1

Pet nezavisnih grupa je 1999. godine identificiralo BACE1 (engl.  *$\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1*) kao  $\beta$ -sekretazu, ključan enzim u patogenezi AB jer katalizira prvi korak u amilodogenoj razgradnji proteina APP što rezultira stvaranjem toksičnog peptida A $\beta$  koji se nakuplja u mozgu AB pacijenata (Vassar i sur., 1999; Cole i Vassar 2007; Vassar, 2014; Yan, 2017). BACE1 je transmembranska asparaginska proteaza tipa 1 koja je usko povezana s proteazama iz skupine pepsina. Građena je od 501 aminokiseline i sastoji se od 5 glavnih domena: signalnog peptida, propeptida, katalitičke domene koja sadrži dva motiva karakteristična za asparaginske proteaze koja tvore aktivno mjesto, transmembransku i citoplazmatsku domenu (Slika 6.). BACE1 se sintetizira kao proenzim u ER nakon čega se cijepa i nastaje zreli peptid (Vassar i Kandalepas, 2011; Yan i Vassar, 2014; Barão i sur., 2016; Yan, 2017; Taylor i sur., 2022). Optimalna aktivnost proteaze BACE1 je pri kiselom pH. Katalitička domena s aktivnim mjestom nalazi se u lumenu kiselih unutarstaničnih odjeljaka sekretornog puta, uključujući endosomime i *trans*-Golgijevu mrežu (Cole i Vassar 2007; Kandalepas i Vassar, 2012; Sathya i sur., 2012). Proteaza BACE1 je visoko eksprimirana u mozgu, posebice u neuronima središnjeg živčanog sustava gdje je smještena u presinaptičkim odjeljcima (Cole i Vassar 2007; Chami i Checler, 2012; Hemming i sur., 2009; Vassar, 2014; Das i Yan 2017). Utvrđeno je da je razina proteina BACE1 te njegova aktivnost povećana u mozgu oboljelih od AB u usporedbi sa zdravim kontrolama (Fukumoto i sur., 2002; Yang i sur., 2003). Biološke funkcije BACE1 se još uvijek istražuju, a do danas je poznato da ima ulogu u razvoju i plastičnosti sinapsi, razvoju dendrita, mijelinaciji, astrogenezi i neurogenezi (Vassar, 2014; Yan i Vassar, 2014; Das i Yan, 2017).



**Slika 6. Primarna struktura proenzima BACE1.** BACE1 je transmembranska asparaginska proteaza tipa 1 izgrađena od 501 aminokiseline. Sastoji se od pet domena: signalnog peptida, propeptida, katalitičke domene sa dva motiva (DTGS, DSGT) koji čine aktivno mjesto enzima, transmembranske i citosolne domene. BACE1 se sintetizira kao proenzim u ER nakon čega u Golgijevom aparatu dolazi do cijepanja njegove propeptidne domene i drugih posttranslacijskih modifikacija te nastaje aktivna proteaza BACE1 (preuzeto i prilagođeno prema Yan i Vassar, 2014).

#### 1.4.1. Proteaza BACE1 - središnji enzim u patogenezi AB

Hipoteza amiloidne kaskade predviđa da je nakupljanje i agregacija peptida A $\beta$  ključan događaj koji pokreće kaskadu patoloških procesa u AB. Ipak, nedavna istraživanja su pokazala da nakupljanje odsječaka CTF $\beta$ /C99 - izravnog C-terminalnog produkta proteolize proteina APP  $\beta$ -sekretazom, a ne nakupljanje A $\beta$ , može potaknuti neurodegenerativne procese i kognitivni poremećaj u AB. Lauritzen i sur. (2012) su na mišjem transgeničnom modelu AB pokazali da u početnim fazama bolesti dolazi do značajnog nakupljanja odsječaka CTF $\beta$ /C99 u neuronima korteksa i hipokampusa i to puno prije pojave detektabilnog peptida A $\beta$ . Kasnije su i druge istraživačke grupe u različitim mišjim modelima AB potvrdile rano nakupljanje odsječaka CTF $\beta$ /C99 u neuronima ukazujući na njihovu ulogu u pokretanju patologije u AB. (Kaur, 2017; Mondragón-Rodríguez i sur., 2018; Lauritzen i sur., 2019). Pronađeno je i da nakupljanje odsječaka CTF $\beta$ /C99 negativno utječe na sposobnost pamćenja u mišjem modelu demencije (Tamayev i sur., 2012). Nadalje, uočeno je da se protein APP i njegovi odsječci nakupljaju u distrofičnim neuritima u mozgovima oboljelih od AB i da je njihovo nakupljanje neurotoksično (Roy i sur., 2005; Kametani i Hasegawa, 2018). Osim neurotoksičnosti odsječaka CTF $\beta$ /C99, pokazano je da je njihovo nakupljanje izravno povezano s disfunkcijom

endolizosomalnog puta, tj. povećanjem organela ranih endosoma, najranijim patološkim obilježjem AB (Jiang i sur., 2010; Lauritzen i sur., 2016; Nixon, 2017). Zbog ovih spoznaja nakupljanje odsječaka CTF $\beta$ /C99, nastalih cijepanjem APP  $\beta$ -sekretazom, i posljedična disfunkcija endolizosomalnog puta su istaknuti kao jedan od važnih pokretača patoloških promjena u AB, što je još dodatno potvrdilo važnu ulogu ove proteaze u patogenezi AB (Lauritzen i sur., 2016; Nixon, 2017).

Ulogu proteaze BACE1 kao ključnog enzima u patogenezi AB potvrđuje i činjenica da postoje mutacije u proteinu APP u blizini mjesta cijepanja  $\beta$ -sekretazom (Lys670Asn, Met671Leu, Ala673Val) koje mijenjaju konformaciju proteina te izazivaju povećano cijepanje  $\beta$ -sekretazom. Takve mutacije su povezane s nastankom obiteljskog oblika AB, jer dovode do povećanog stvaranja A $\beta$ . Nedavno pronađena „islandska“ mutacija u proteinu APP (Ala673Thr), koja je označena kao protektivna jer uzrokuje smanjeni rizik nastanka AB i kognitivne disfunkcije u starosti, pokazala je smanjenu proteolizu proteina APP  $\beta$ -sekretazom te time smanjeno stvaranje peptida A $\beta$  (Jonsson i sur., 2012; Maloney i sur., 2014). Nosioci samo jednog alela ove mutacije imaju za 20% smanjenu razinu A $\beta$  te se smatraju „zaštićenim“ od razvoja AB (Vassar, 2004, Cole i Vassar, 2007; Yan i Vassar, 2014). Također delecija gena *BACE1* u mišjem modelu AB rezultirala je smanjenim nakupljanjem peptida A $\beta$  i kognitivnim oporavkom (Cole i Vassar 2007; McConlogue i sur., 2007; Ohno i sur., 2007). Sumarno, ovi nalazi su ukazali na značajan potencijal inhibicije proteaze BACE1 u terapiji AB, jer njena inhibicija izravno smanjuje razine odsječaka CTF $\beta$ /C99 i peptida A $\beta$  – dvije ključne molekule koje se nakupljaju u mozgu oboljelih te pridonose razvoju patoloških karakteristika AB.

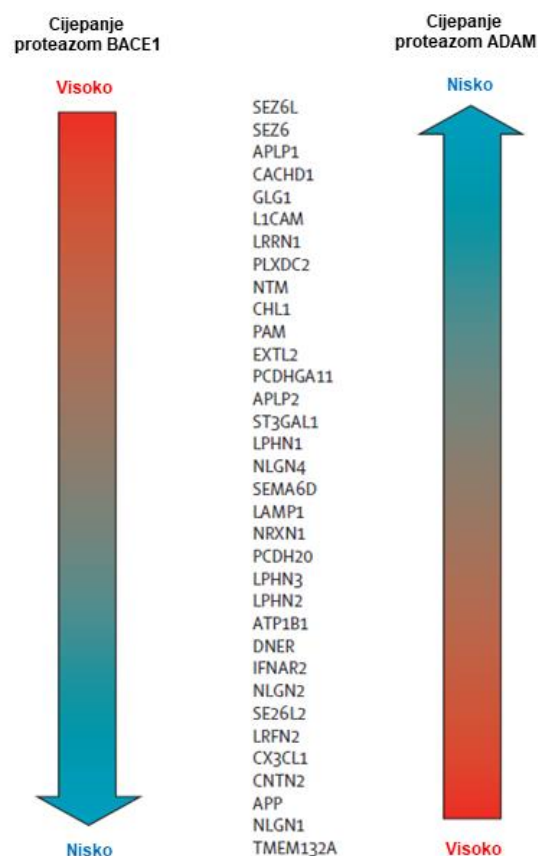
#### 1.4.2. Terapijski potencijal proteaze BACE1

Inhibitori proteaze BACE1 već se neko vrijeme intenzivno ispituju za razvoj terapije AB. Istraživanja su provedena na različitim modelima. Pokazano je da inhibicijom proteaze BACE1 u neuronima dobivenim iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica pacijenata sa sporadičnim i obiteljskim oblikom AB dolazi do značajnog smanjenja razine A $\beta$  kao i do smanjenja razine fosforiliranog proteina tau u odnosu na kontrolu (Israel i sur., 2012). Istraživanja na različitim životinjskim modelima su pokazala da inhibicija proteaze BACE1 smanjuje razine A $\beta$  u plazmi i likvoru (Yan i Vassar, 2014; Kennedy i sur., 2016; Neumann i sur., 2018; Das i Yan, 2019). Osim toga, neki BACE1 inhibitori su uspjeli značajno smanjiti razinu peptida A $\beta$  u mozgu miševa što se pozitivno odrazilo i na kognitivne sposobnosti

(Fukumoto i sur., 2010). Inhibitori BACE1 su ušli i u kliničke faze ispitivanja gdje je pokazana uspješnost određenih inhibitora u smanjenju amiloidnih vrsta i odsječaka CTF $\beta$ /C99 u oboljelih od AB. Nažalost ova istraživanja su prekinuta zbog pojave određenih nuspojava i u nekim slučajevima uočenog negativnog učinka inhibicije na kognitivne sposobnosti ispitanika (Neumann i sur., 2018; Timmers i sur., 2018; Das i Yan, 2019). Osim toga, *BACE1*<sup>-/-</sup> miševi su se isprva smatrali zdravi- vijabilni i fertilni. Međutim, njihova detaljna analiza je utvrdila nekoliko značajnih nedostataka: hipomijelinaciju, smanjenu gustoću dendritičkih trnova, promjene u astrogenezi i neurogenezi, probleme s motorikom i pamćenjem, shizofreno ponašanje i epileptične napadaje (Chow i sur., 2010; Hemming i sur., 2009; Vassar, 2014; Barão i sur., 2016; Munro i sur., 2016). Posljednja klinička ispitivanja inhibitora proteaze BACE1 zaustavljena su u trećoj fazi ispitivanja krajem 2019. g., a trenutno nema aktivnih kliničkih istraživanja vezanih uz inihibitore BACE1 ([www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)). Iako danas ne postoje odobreni inhibitori proteaze BACE1 za liječenje AB, dosadašnja klinička istraživanja pokazala su da inhibicija proteaze BACE1 uspješno smanjuje razine A $\beta$  u pacijentima oboljelima od AB te, stoga, inhibicija BACE1 još uvijek predstavlja dobar pristup za razvoj učinkovite terapije AB. Najveći izazovi potencijalne primjene inhibitora BACE1 u liječenju AB vezani su uz otkrivanje optimalne doze inhibicije (npr. inhibicija proteaze BACE1 20% može biti dostatna da prevenira nakupljanje peptida A $\beta$  i pojavu AB) te vremena početka terapije koji bi dali najbolje rezultate s minimalnim nuspojavama (Das i Yan, 2019). Poteškoće u razvoju inhibitora proteaze BACE1 kao terapije AB otvorila su brojna pitanja te ukazala na potrebu novih spoznaja o funkciji ove proteaze i mehanizma njenog djelovanja kako bi se uspješno smanjile moguće nuspojave.

#### 1.4.3. Supstrati proteaze BACE1 - Sez6 obitelj proteina

Primijećene nuspojave uslijed inhibicije proteaze BACE1 vjerojatno su posljedica činjenice da ova proteaza ne cijepa samo protein APP. Nedavni pronalazak velikog broja drugih supstrata proteaze BACE1 otkrio je značajnu ulogu ove proteaze u fiziološkoj funkciji mozga (Slika 7.), te je ukazao da inhibicija aktivnosti ove proteaze može dovesti do smanjene proteolize i drugih važnih proteina, osim proteina APP, što u konačnici može rezultirati nastankom neželjenih nuspojava (Kuhn i sur., 2012; Zhou i sur., 2012; Stützer i sur., 2013; Yan i Vassar, 2014).



**Slika 7. Supstrati proteaze BACE1 u mozgu.** Supstrati proteaze BACE1 navedeni su od onih koji se isključivo ili pretežno cijepaju proteazom BACE1 prema onima čije je cijepanje proteazom BACE1 nisko (lijevo). Navedeni supstrati se cijepaju i enzimima iz obitelji ADAM (od engl. *A Disintegrin And Mealloprotease*), ali je preferencija cijepanja suprotna onoj proteaze BACE1 (desno) (preuzeto i prilagođeno prema Yan i sur., 2014).

Za razliku od proteina APP, koji se cijepa i  $\alpha$ -sekretazom, proteomske studije su pokazale da su proteini Sez6 (od engl. *seizure protein 6*) i Sez6L (od engl. *seizure 6-like protein*) isključivi fiziološki supstrati proteaze BACE1 u mozgu (Kuhn i sur., 2012; Yan i Vassar, 2014; Pignoni i sur., 2016). Ovi proteini, uz Sez6L2, pripadaju Sez6 obitelji proteina. Visoko su eksprimirani u neuronima u cijelom mozgu, tijekom razvoja i u odrasloj dobi, a lokalizirani su u somatodendritičkim odjeljcima (Gunnensen i sur., 2007). Sez6 je najviše eksprimiran u embrionalnom i postnatalnom neokorteksu, a kod odraslih miševa eksprimiran je u korteksu i hipokampusu. Sez6L je prisutan u svim regijama mozga, ali je njegova najveća ekspresija pronađena u malom mozgu i Purkinjeovim neuronima (Kim i sur., 2002; Gunnensen i sur., 2007; Čaušević i sur., 2018). Sez6 i Sez6L su transmembranski proteini, s velikom

izvanstaničnom regijom. Sadrže CUB i SRC domene, MpxY motiv i PTB domenu (od engl. *phosphotyrosine-binding domain*) kakvu sadrži i APP i neki drugi proteini koji imaju ulogu staničnih receptora (Pigoni i sur., 2017).

Uloge BACE1 supstrata Sez6 i Sez6L se još uvijek istražuju, no poznato je da imaju ulogu u razvoju i (dis)funkciji sinapsi - jednoj od karakteristika bolesti NPC, kao i AB (Osaki i sur., 2011). Karakterizacija mišjeg modela kojem su deletirana sva tri gena obitelji Sez6 je pokazala da ovi proteini imaju ulogu i u strukturi dendritičkih trnova, kognitivnim funkcijama te u motoričkom učenju i koordinaciji (Nash i sur., 2020). Daljnja istraživanja su ukazala na ulogu proteina Sez6 u pravilnom grananju dendrita i gustoći dendritičkih trnova čime je funkcija ovog proteina povezana s pravilnim povezivanjem kortikalnih neurona i njihovom komunikacijom. Također, pokazano je da Sez6 ima ulogu u rastu neurita i stvaranju sinapsi (Gunnarsen i sur., 2007; Kuhn i sur., 2012; Zhu i sur., 2018). Za razliku od Sez6, Sez6L je manje istražen te se manje zna o njegovoj funkciji. No, nedavna istraživanja su pokazala da bi Sez6L mogao biti povezan s motoričkim poremećajima uočenim kod miševa kojima nedostaju sva tri proteina Sez6 obitelji. Mutacije u genima za ove proteine su povezane i s nekim neurorazvojnim i psihijatrijskim poremećajima ukazujući na njihove potencijalne uloge u normalnom funkcioniranju mozga. Sez6 je povezan s epileptičnim napadajima te dječjom shizofrenijom, dok je Sez6L povezan sa bipolarnim poremećajem i autizmom (Kuhn i sur., 2012; Munro i sur., 2016; Pigoni i sur., 2016). Kako su proteini Sez6 i Sez6L isključivi supstrati proteaze BACE1 u mozgu prepoznata je njihova uloga kao potencijalnih biomarkera za praćenje aktivnosti BACE1 što je vrijedan podatak za razvoj novih terapija i pronalazak odgovarajuće razine modulacije BACE1 aktivnosti (Pigoni i sur., 2016).

Uloge proteaze BACE1 i njenih supstrata u mozgu u zdravlju i u bolesti još uvijek nisu razjašnjene. Razumijevanje biologije tj. mehanizma djelovanja BACE1 i uloge proteolize različitih supstrata BACE1 važno je za učinkovitu procjenu terapijskog potencijala inhibicije ove proteaze u liječenju AB, ali potencijalno i u liječenju bolesti NPC s obzirom na uočeno povećano cijepanje supstrata BACE1 u NPC1 staničnim i životinjskim modelima (Malnar i sur., 2010; Čaušević i sur., 2018).

#### 1.4.4. BACE1 i bolest NPC- naša dosadašnja istraživanja

Naša dosadašnja istraživanja na staničnom modelu bolesti NPC - CHO *NPC1*-null stanicama (CHO od engl. *Chinese Hamster Ovary* kojima je deletiran gen *NPC1*) su pokazala da uslijed nedostatka proteina NPC1 i nakupljanja kolesterola dolazi do povećanog nastanka odsječaka CTF $\beta$ /C99, sAPP $\beta$  i unutarstaničnog peptida A $\beta$ 40. Također, utvrdile smo da je u ovim stanicama promijenjen stanični transport i smještaj proteina APP i BACE1 u lipidnim splavima i u endosomima, organelima koje imaju optimalni pH za aktivnost BACE1, što dovodi do povećanog cijepanja APP-a proteazom BACE1 (Malnar i sur., 2010; Košićek i sur., 2010; Malnar i sur., 2012). Dodatno, naši nedavni rezultati na mišjem modelu bolesti NPC (BALB/cNctr-*Npc1*<sup>m1N</sup>/J) su pokazali da dolazi do povećane proteolize, ne samo proteina APP već i proteina Sez6 i Sez6L u mozgovima 4 tjedna starih asimptomatskih *NPC1*<sup>-/-</sup> miševa ukazujući na poremećenu funkciju i potencijalnu ulogu proteaze BACE1 u najranijem stadiju bolesti NPC (Čaušević i sur., 2018).



## 2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog doktorskog rada je istražiti ulogu proteaze BACE1 u patogenezi Niemann-Pickove bolesti tipa C (NPC) te ispitati može li inhibicija proteaze BACE1 predstavljati novu strategiju liječenja/ublažavanja patoloških karakteristika ove još uvijek neizlječive bolesti. Pri tom ćemo koristiti mišji model bolesti NPC (BALB/cNctr-*Npc1<sup>m1N</sup>/J*), odnosno primarne kulture kortikalnih i hipokampalnih neurona, kulture organotipskih moždanih rezova kao i izdvojene moždane regije hipokampusa i malog mozga ovih miševa u odnosu na iste *in vitro* / *ex vivo* modele wt miševa.

Kako bismo ostvarili ovaj cilj provest ćemo sljedeće specifične ciljeve:

- Ispitati proteolizu i stanični smještaj supstrata BACE1 u primarnim kulturama neurona i utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na proteolizu i smještaj ovih supstrata te na patološke značajke bolesti NPC.
- Uspostaviti kulturu organotipskih rezova mozga i ispitati utjecaj inhibicije BACE1 na patološke značajke bolesti NPC.
- Analizirati sastav lipidoma u moždanim regijama i u endosomskim frakcijama malog mozga i hipokampusa miševa NPC1 i wt.

U sklopu ovog doktorata ispitat ćemo hipotezu da povećano cijepanje proteazom BACE1 doprinosi nastanku patoloških karakteristika bolesti NPC te da inhibicija BACE1 može predstavljati alternativni pristup ublažavanja simptoma/progresije ove još uvijek neizlječive bolesti. Također, ispitat ćemo hipotezu da poremećaj sastava lipidoma u različitim moždanim regijama u bolesti NPC, npr. u hipokampusu i malom mozgu, može doprinijeti različitoj vulnerabilnosti ovih regija. Naposljetku, ispitat ćemo hipotezu da nakupljanje kolesterola i drugih lipida u kasnim endosomima/lizosomima uzrokuje poremećenu funkciju i ranih endosoma, tj. promjene lipidnog sastava ranih endosoma, ukazujući na potencijalnu disfunkciju biogeneze endosoma u bolesti NPC. Sumarno, pretpostavljamo da disfunkcija proteaze BACE1 i njenih supstrata ima ulogu u patogenezi bolesti NPC.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzgoj mišjeg modela bolesti NPC

U ovom doktorskom radu korišten je mišji soj BALB/cNctr-*Npc1*<sup>mlN</sup>/J (stock number 003902, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, SAD). Ovaj soj je najčešće korišten mišji model u istraživanju ove rijetke nasljedne bolesti. Ovaj model ima spontanu mutaciju u genu za protein NPC1, koja onemogućava nastanak proteina NPC1, te pokazuje patološke karakteristike bolesti kao što su neurodegeneracija Purkinjeovih neurona, hiperfosforilacija tau proteina i neuroinflamacija- aktivacija astrocita i mikroglija. Miševi su uzgajani u Pogonu laboratorijskih životinja na Institutu Ruđer Bošković (IRB). Uzgoj životinja i svi pokusi su provedeni u skladu s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 39/17), a istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva IRB-a i od strane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (klasa UP/I-322-01/17-01/15). Miševi su uzgajani u 12 satnim ciklusima dan/noć uz prisutnost standardne mišje prehrane i vode *ad libitum*. Za održavanje linije te dobivanje željenih uzoraka miševa s mutacijom u genu *NPC1* koji ne sintetiziraju protein NPC1 (u daljnjem tekstu miševi NPC1) i miševa divljeg tipa (u daljnjem tekstu wt, od engl. *wild type*) bilo je potrebno pariti NPC1-heterozigote, jer miševi NPC1 nisu fertilni. Za primarnu kulturu neurona korišteni su mladunci postnatalnog dana 0 ili 1 (P0-P1). Za kulturu mišjih organotipskih rezova mozgovog korišteni su mladunci 7 dana starosti (P7), za frakcioniranje endosoma te analizu lipidoma korištene su životinje starosti 4 tjedna.

##### 3.1.1. Genotipizacija miševa

###### 3.1.1.1. Izolacija DNA iz tkiva repa miševa

DNA potrebna za genotipizaciju miševa izolirana je iz uzorka tkiva repa miša. Tkivo repa uronjeno je u 100 µl 50mM NaOH otopine i inkubirano pri 95°C u termobloku 3 puta po 15 min. Nakon svake inkubacije uzorci su dobro vorteksirani (Vortex Mixer, neoLab Migge GmbH, Njemačka) i kratko centrifugirani (Eppendorf 5424, Njemačka). Nakon treće inkubacije u uzorke je dodano 10 µl 1,5 M Tris otopine (18,15 g Tris base (Sigma-Aldrich, SAD), dH<sub>2</sub>O do 100 mL, pH 8,8) te su uzorci vorteksirani i zatim centrifugirani 5 min, na 16000×g, pri 4°C (Eppendorf 5415R, Njemačka). Nakon centrifugiranja supernatant je prebačen u novu sterilnu

tubicu. Izmjerena je koncentracija DNA na spektrofotometru (NanoPhotometer, Implemen GmbH, Njemačka) te su svi uzorci razrijeđeni u sterilnoj mQ-H<sub>2</sub>O do konačne koncentracije DNA 10 ng/μl koja je korištena za daljnju analizu.

### 3.1.1.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Genotip miševa određen je metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) na uzroku DNA izoliranom iz vrha repa miševa. Napravljene su dvije reakcijske smjese od 20 μl za svaki uzorak (prema Tablici 1.). Jedna reakcijska smjesa je sadržavala početnice za alel divljeg tipa *NPCI*, a druga za mutantni alel *NPCI*. Reakcija se odvijala u uređaju za PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) pod uvjetima koji su navedeni u Tablici 1.

**Tablica 1.** Sastav reakcijske smjese za jedan uzorak za genotipizaciju miševa *NPCI*.

<b>PCR smjesa za alel divljeg tipa <i>NPCI</i></b>		<b>PCR smjesa za mutirani alel <i>NPCI</i></b>	
	Volumen (μl)		Volumen(μl)
<b>Sterlina mQH<sub>2</sub>O</b>	10,35	<b>Sterlina mQH<sub>2</sub>O</b>	10,35
<b>5xPCR pufer</b>	4	<b>5xPCR pufer</b>	4
<b>2,5 mM dNTP</b>	1,6	<b>2,5 mM dNTP</b>	1,6
<b>20 μM početnica 28</b>	1	<b>20 μM početnica 25</b>	1
<b>20 μM početnica 29</b>	1	<b>20 μM početnica 27</b>	1
<b>5 U/μl Taq polimeraza</b>	0,05	<b>5 U/μl Taq polimeraza</b>	0,05
<b>10 ng/ μl genomska DNA</b>	2	<b>10 ng/ μl genomska DNA</b>	2
<b>Konačni volumen</b>	20	<b>Konačni volumen</b>	20
<b>Veličina produkta</b>	<b>173 bp</b>	<b>Veličina produkta</b>	<b>475 bp</b>

**Tablica 2.** Početnice korištene za genotipizaciju miševa *NPCI*.

<b>Početnica</b>	<b>Genotip <i>NPCI</i></b>	<b>Sekvenca 5'→3'</b>
<b>oIMR0928</b>	Alel divljeg tipa	CTG TAG CTC ATC TGC CAT CG
<b>oIMR0929</b>	Alel divljeg tipa	TCT CAC AGC CAC AAG CTT CC
<b>oIMR4125</b>	Mutirani alel	GGT GCT GGA CAG CCA AGT A
<b>oIMR0927</b>	Mutirani alel	TGA GCC CAA GCA TAA CTT CC

**Tablica 3.** Uvjeti reakcije PCR (PCR program) za umnožavanje DNA za genotipizaciju miševa NPC1.

	<b>Temperatura</b>	<b>Trajanje</b>	
<b>Početa denaturacija</b>	94°C	3 min	
<b>Denaturacija</b>	94°C	30 s	35 ciklusa
<b>Prianjanje početnica</b>	63°C	45 s	
<b>Elongacija</b>	72°C	45 s	
<b>Završna sinteza/elongacija</b>	72°C	2 min	
	10°C	∞	

### 3.1.1.3. Elektroforeza u agaroznom gelu

Odsječci DNA umnoženi metodom PCR razdvojeni su horizontalnom elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu. Agaroz (Sigma-Aldrich, SAD) je otopljena zagrijavanjem u 1xTAE puferu (40 mM Tris baza, Sigma-Aldrich, SAD, 20 mM octena kiselina, J.T.Baker, Thermo Fisher Scientific, SAD, 1mM EDTA, Sigma-Aldrich, SAD, dH<sub>2</sub>O). U smjesu je dodana GelRed boja u razrijeđenju 1:20000 (GelRed Nucleic Acid Stain, Biotium, SAD). Nakon što je gel polimerizirao nanoseno je 20 µl svakog DNA produkta umnoženog PCR reakcijom. Elektroforeza se odvijala pri stalnom naponu od 100 V, 23 min u 1xTAE puferu u komercijalnom sustavu za horizontalnu elektroforezu (BioRad, SAD). Dobivene vrpce DNA na gelu vizualizirane su na uređaju UVITEC (Uvitec Cambridge, UK).

## 3.2. Primarne kulture mišjih neurona

Za primarnu kulturu mišjih neurona korišteni su miševi soja BALB/cNctr-*Npc1*<sup>m<sup>IN</sup>/J</sup> (stock number 003902, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, SAD) koji su opisani u poglavlju 3.1. Budući da miševi NPC1 nisu fertilni, parenjem heterozigotnih miševa dobiveni su miševi NPC1 i wt. Izolacijom mozga mladunaca na postnatalni dan 0 ili 1 (P0-1) dobivene su primarne kulture mišjih neurona miševa NPC1 i wt. Za izradu primarnih kortikalnih i hipokampalnih neurona korišten je protokol prilagođen prema Beaudoin i sur., 2012.

### 3.2.1. Priprema pribora i kemikalija za primarnu kulturu neurona

Sakalca za imunocitokemijsku analizu na kojima će rasti neuroni (12 mm promjera, 1.5 H, Paul Marienfeld GmbH, Njemačka) su posložena u porculanske nosače u staklenoj posudi i ostavljena u 65% dušičnoj kiselini (Thermo Fisher Scientific, SAD) preko noći, nakon čega su isprana u sterlinoj mQ-H<sub>2</sub>O pet puta po 30 min. Nakon ispiranja stakalca u porculanskim nosačima su premještena u suhu staklenu posudu, te su sušena u peći za suhu sterilizaciju (SE-10, Termo-medicinski aparati Bodalec & Havočić) jedan sat na 100°C a zatim sterilizirana na 220°C 6h.

Površine na koje će se nasađivati neuroni potrebno je prije nasađivanja pripremiti tj. prekriti otopinom poli-L-lizina. Poli-L-lizin (Sigma-Aldrich, SAD) je otopljen u 0,1M boratnom puferu (boratna kiselina, Kemika, Hrvatska; natrijev tetraborat, Sigma Aldrich, SAD; dH<sub>2</sub>O, pH 8,5) konačne koncentracije 0,5 mg/mL. Otopina poli-L-lizina je sterilizirana filtriranjem koristeći 0,22 µM filter (TPP, Sigma-Aldrich, SAD).

Za analizu metodom Western blot za nasađivanje neurona korištene su ploče sa šest bunarića (Nunclon, Thermo Fisher Scientific), a za imunocitokemijsku analizu korištena su stakalca koja su složena u ploče sa šest bunarića (Nunclon, Thermo Fisher Scientific, SAD; četiri staklaca po bunariću). Otopina poli-L-lizina je raspoređena po bunarićima i po stakalcima u bunarićima tako da ih ravnomjerno prekrije. Otopina je ostavljena preko noći u pločama prekrivenim folijom na sobnoj temperaturi ili su ploče inkubirane tri sata u inkubatoru (Thermo Fisher Scientific, SAD) na 37°C.

Sutradan ili nakon inkubacije, otopina poli-L-lizina je isprana tri puta sterlinom mQ-H<sub>2</sub>O. U bunariće ploče stavljen je medij za nasađivanje neurona i ploče su vraćene u inkubator na 37°C do nasađivanja neurona. (Medij ne smije stajati više od 24 h u inkubatoru).

**Tablica 4.** Mediji za pripremu primarne kulture neurona i njihov sastav.

<b>Medij</b>	<b>Komponente/Sastav</b>
<b>Medij za disekciju i disocijaciju</b>	-HBSS bez kalcijevih i magnezijevih iona (engl. <i>Hanks' Balanced Salt solution</i> , Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -1 mM natrijev piruvat (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -0,1% D-(+)-glukoza (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -10 mM HEPES (Sigma-Aldrich, SAD)
<b>Medij za nasađivanje</b>	-BME (od engl. <i>Basal Medium Eagle</i> , Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -10% konjski serum (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -0,45% D-(+)-glukoza -1mM natrijev piruvat -2mM L-glutamin (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -1% penicilin/streptomycin (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD)
<b>Medij za održavanje</b>	-neurobazalni medij ( <i>Neurobasal media</i> , Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -2% suplement B27 (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -2mM L-glutamin -1% penicilin/streptomycin

### 3.2.2. Disekcija tkiva

Unutar 24h od okota mladunci su odvojeni od majke i žrtvovani dekapitacijom. Razrezana je koža na glavi kako bi se vidjela lubanja. Po sredini lubanje je napravljen rez od dna mozga prema naprijed. Razdvojene su obje polovice lubanje i mozak je pažljivo prenesen u medij za disekciju i disocijaciju (opisan u Tablici 4.) u plastičnu petrijevku promjera 30 mm (TPP, Sigma-Aldrich, SAD).

Pod mikroskopom za seciranje (Olympus SZ61 Stereo Microscope, Olympus, Japan) napravljena je disekcija moždanih regija. Polutke kore velikog mozga su razdvojene sagitalnim rezom duž sredine mozga. Uklonjene su meninge i tkivo srednjeg mozga i talamus, te je zatim hipokampus odvojen od kore velikog mozga. Tkivo kore velikog mozga i hipokampusa je sakupljeno u zasebne tubice koje sadrže medij za disocijaciju i disekciju. Za svakog miša zasebno je ponovljen isti postupak.

Prikupljen je i uzorak repića koji je korišten za genotipizaciju (opisano u poglavlju 3.1.1.).

### 3.2.3. Obrada tkiva kore velikog mozga i hipokampusa

Izolirano tkivo je isprano dva puta sa svježim, novim medijem za disocijaciju i disekciju. Nakon ispiranja tkivo je disocirano u novom medij za disekciju i disocijaciju u koji je zatim dodana otopina tripsina (konačna koncentracija 0,25%, Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) i tkivo je inkubirano u vodenoj kupelji pri 37°C, 20 min uz miješanje svakih 5 min. Nakon inkubacije u vodenoj kupelji dodana je sterilna DNazaI (Sigma-Aldrich,SAD) i tkivo je inkubirano 5 min na sobnoj temperaturi u sterilnom laminaru. Zatim je tkivo dva puta isprano u mediju za disekciju i disocijaciju a potom dva puta u mediju za nasađivanje. Tkivo je resuspendirano u mediju za nasađivanje i triturirano koristeći sterilne staklene Pasteur pipete (Carl Roth GmbH, Njemačka) zaobljenog vrha koje su prethodno obložene sterilnim 4% -tnim albuminom iz goveđeg seruma (Sigma-Aldrich,SAD). Na ovaj način tkivo se usitnilo i dobila se homogena suspenzija stanica koja se koristila za nasađivanje.

Neuroni su nasađeni dodavanjem stanične suspenzije u medij u pločama s bunarićima te su ploče zatim inkubirane u inkubatoru pri 37°C kroz 4h. Nakon 4 h stanicama je uklonjen medij za nasađivanje te je dodan medij za održavanje. Nakon zamjene medija stanice su vraćene u inkubator i uzgajane pri 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.2.4. Održavanje kulture primarnih neurona

Dva puta tjedno iz svakog bunarića uklonjeno je pola medija i dodano je pola svježeg medija za održavanje. Uklanja se samo pola medija jer neuroni izlučuju čimbenike koji su im potrebni za rast i preživljavanje. Neuroni su uzgajani i praćeni u kulturi kroz 14 dana, nakon čega su neuroni fiksirani i pripremljeni za daljnju analizu ili pohranjeni.

### 3.3. Kultura organotipskih rezova mišjih mozgova

Za uspostavu kulture kortiko-hipokampalnih organotipskih rezova korišteni su mladunci miševa NPC1 i wt, stari 7 dana (P7) soja BALB/cNctr-*Npc1*<sup>m1N</sup>/J (stock number 003902, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, SAD) (soj opisan u poglavlju 3.1.) Mladunci su genotipizirani prema protokolu opisanom u poglavlju 3.1.1. Kultura kortiko-hipokampalnih organotipskih rezova pripravljena je prema protokolu membranske međupovršine prilagođene prema Stoppini i sur., 1991.

#### 3.3.1. Priprema pribora i kemikalija za kulturu organotipskih rezova mišjih mozgova

Organotipski rezovi su uzgajani na poroznim politetrafluoroetilen (PTFE) membranskim umetacima (PICM ORG 050, Millipore) umetnutim u bunariće ploče sa šest bunarića (Nunclon, Thermo Fisher Scientific, SAD; jedan umetak po bunariću). U bunarić je stavljeno po 1 ml medija za održavanje (opisan u Tablici 5.) i umetak, te je ploča stavljena u inkubator na 37°C do nasadivanja rezova na membranu. Prije disekcije pripremljen je medij za disekciju (opisan u Tablici 5.) koji je raspoređen u 6 cm široke petrijevke (Nunclon, Thermo Fisher Scientific, SAD) koje su pohranjene na +4°C do disekcije. Za svakog mladunca pripravljene su po tri 6 cm široke petrijevke. Oba pripravljena medija su sterilizirana filtriranjem koristeći 0,22 µm filter (TPP, Sigma-Aldrich, SAD).

**Tablica 5.** Mediji za uzgoj organotipskih rezova mišjih mozgova i njihov sastav.

Medij	Komponente/Sastav
Medij za održavanje	- MEM (engl. <i>Minimum Essential Medium</i> , + Earl's Salts, 25mM HEPES, Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -25% HBSS sa kalcijevim i magnezijevim ionima (engl. <i>Hanks' Balanced Salt solution</i> , Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -25% konjski serum (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) - 1mM L-glutamin (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD)



<b>Medij za disekciju</b>	- MEM (engl. <i>Minimum Essential Medium</i> , + Earl's Salts, 25mM HEPES, Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -1% penicilin/streptomycin (Gibco, Thermo Fischer Scientific, SAD) -1mM Tris pufer pH 7.2
---------------------------	--

### 3.3.2. Disekcija tkiva mišjeg mozga

Mladunci stari sedam dana žrtvovani su dekapitacijom. Razrezana je koža na glavi te je napravljen rez po sredini lubanje od dna mozga prema naprijed, te dva lateralna reza na svakoj strani. Uklonjena je lubanja te je mozak oprezno, sa okruglo spatulom, stavljen u 6 cm široku petrijevku s hladnim medijem sa disekciju. Hemisfere su pažljivo razdvojene spatulom i pod mikroskopom za seciranje (Olympus SZ61 Stereo Microscope, Olympus, Japan) pažljivo su uklonjenje meninge te olfaktorni bulb, mali mozak te tkivo srednjeg mozga i talamus, kako bi na kraju ostali samo kora velikog mozga i hipokampus.

### 3.3.3. Priprema organotipskih rezova mišjih mozgova za nasađivanje

Nakon disekcije kora velikog mozga s hipokampusom je prenesena na pločicu za rezanje, tkivo je malo poravnato sa spatulom kako bi se pričvrstilo za podlogu te je uklonjen višak medija koji je ostao na pločici za rezanje. Prije rezanja tkivo je orijentirano tako da je položaj hipokampusa okomit na smjer rezanja. Tkivo je izrezano na sagitalne rezove debljine 350  $\mu$ M na McIlwain rezaču za tkivo (Model TC752, Mickle Laboratory Engineering Company). Nakon rezanja izrezano tkivo je oprezno spatulom prebačeno u novu petrijevku s hladnim medijem za disocijaciju. Pod mikroskopom za seciranje, rezovi su pažljivo razdvojeni i svaki rez je prerezan tako da ostane hipokampus i kora velikog mozga iznad hipokampusa. Cjeloviti i neoštećeni rezovi su staklenom Pasteur pipetom prebačeni u novu petrijevku sa svježim, hladnim medijem za disocijaciju. Rezovi su inkubirani pri 4°C, 30 min. Nakon inkubacije rezovi su nasađivani na prethodno pripremljene umetke sa medijem za održavanje u ploči sa šest bunarića. Po jednom umetku nasađeno je četiri reza, namješteni su tako da se nalaze u sredini umetka i da se međusobno ne dodiruju. Nakon što su svi rezovi nasađeni u dobrom položaju, pipetom je uklonjen višak medija s membrane koji je zaostao prilikom nasađivanja rezova. Nasađeni rezovi su vraćeni u inkubator na 37°C i 5% CO<sub>2</sub>.

#### 3.3.4. Održavanje organotipskih rezova mišjih mozgova u kulturi

Dan nakon disekcije i nasađivanja medij za održavanje je zamijenjen sa svježim medijem. Nakon toga medij je mijenjan dva puta tjedno. Organotipski rezovi mozga su uzgajani u kulturi kroz 25 dana.

### 3.4. **Tretman inhibitorom proteaze BACE1**

Za ispitivanje molekularnog mehanizma i uloge povećanog djelovanja proteaze BACE1 u patogenezi bolesti NPC korišten je farmakološki pristup. Za tretman je korišten inhibitor proteaze BACE1 C3 ( $\beta$ -Secretase Inhibitor IV, Calbiochem, Merck). Inhibitor C3 se veže na aktivno mjesto proteaze BACE1 i na taj način blokira njenu proteolitičku aktivnosti.

#### 3.4.1. Tretiranje primarnih kultura mišjih neurona inhibitorom proteaze BACE1

Dvanaesti dan u kulturi mišji neuroni su tretirani s inhibitorom C3 konačne koncentraciji 2  $\mu$ M. Tretman je trajao 48h. Nakon 48h hipokampalni neuroni su fiksirani i pripremljeni za imunocitokemijsku analizu. Kortikalni neuroni i pripadajući mediji u kojem su rasli su pohranjeni su za daljnje analize.

#### 3.4.2. Tretiranje organotipskih rezova mišjih mozgova inhibitorom proteaze BACE1

Organotipski rezovi mišjih mozgova su nakon dvadeset jednog dana u kulturi tretirani inhibitorom C3 u konačnoj koncentraciji 2  $\mu$ M dva puta po 48 h (ukupno vrijeme inhibicije 96 h). Iz bunarića je maknut sav medij i dodano je po 1 ml svježeg medija ili medija s inhibitorom C3 te su rezovi vraćeni u inkubator na 48h. Nakon 48h ponovljen je isti postupak. Rezovi su nakon tretmana od ukupno 96 h fiksirani i pripremljeni za imunohistokemijske analize.

### 3.5. Frakcioniranje endolizosomalnih vezikula mišjih moždanih regija

Za dodatno ispitivanje smještaja supstrata BACE1 u endolizosomalnom putu korištena je metoda frakcioniranja endolizosomalnih vezikula iz tkiva hipokampusa i malog mozga 4 tjedana starih miševa NPC1 i wt.

Miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom. Mozak je izoliran i odvojene su polutke. Svaka polutka disecirana je na mali mozak, koru velikog mozga, hipokampus i ostatak mozga. Disecirani dijelovi mozga su zamrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni pri  $-80^{\circ}\text{C}$  do daljnje analize. Frakcioniranje endolizosoma u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze provedeno je po protokolu prilagođenom prema de Araújo i sur. (2015). Cijeli postupak je izvođen na ledu.

#### 3.5.1. Homogenizacija mišjih moždanih regija

Prije homogenizacije disecirani zamrznuti dijelovi mozga - mali mozak i hipokampus su izvagani na analitičkoj vagi te je dodan 8 puta veći volumen pufera za homogenizaciju (1:8 w/v) za mali mozak i 10 puta veći volumen za hipokampus (1:10 w/v) (250 mM saharoza, 3mM imidazol (Fluka), 1mM EDTA (Kemika, Hrvatska), koktel inhibitora proteaze (Complete, Roche Applied Science), inhibitori fosfataza (Roche Applied Science) i 0.03 mM cikloheksimid pH 7.4 (Sigma-Aldrich, SAD), dH<sub>2</sub>O). Tkivo je homogenizirano u staklenom homogenizatoru s po 30 udaraca dok homogenati nisu postali u potpunosti homogeni. Nakon toga dobiveni homogenati su dodatno homogenizirani 10 puta propuštanjem kroz 23G iglu koristeći špricu od 1,5 ml. Homogenati su centrifugirani na 1000×g, 10 minuta pri 4°C (Eppendorf 5415R, Njemačka). Nakon centrifugiranja supernatant je odvojen u novu plastičnu tubicu i dodatno centrifugiran na 3000×g, 10 minuta pri 4°C kako bi se uklonile jezgre i ostatci liziranih stanica. Dobiveni supernatant je odvojen u novu tubicu i predstavlja postnuklearni supernatant - PNS (engl. *postnuclear supernatant*). PNS sadrži suspenziju staničnih organela i korišten je dalje za frakcioniranje u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze.

### 3.5.2. Izolacija ranih i kasnih endosoma centrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze

Centrifugiranje u diskontinuiranom gradijentu gustoće je uobičajena metoda za razdvajanje unutarstaničnih organela. Organeli se razdvajaju na temelju gustoće. Tijekom centrifugiranja organeli putuju od dna prema vrhu gradijenta dok ne dosegnu svoj izopiknički položaj unutar gradijenta gdje se zaustave i talože. Gustoća organela ovisi o njegovoj veličini, obliku i omjeru lipidi/proteini.

Prethodno dobiveni PNS je pomiješan s 62%-tnom otopinom saharoze prema formuli:  $(\text{volumen PNS-a})(0.085)+0.62*x=0.406*(\text{volumen PNS-a})+0.406*x$ , gdje je  $x$  količina 62% otopine saharoze koju je potrebno dodati. Tri mililitra 40,6% otopine saharoze je stavljeno na dno tubice za ultracentrifugu (14x89mm, Beckman Coulter, SAD). Na taj sloj dodano je redom: 1.5 volumen (4.5 ml) 35% otopine saharoze, 1 volumen (3ml) 25% otopine saharoze, 1 ml homogenizacijskog pufera (sastav otopina saharoze se nalazu Tablici 6). Pripremljeni gradijent je centrifugiran u ultracentrifugi (Beckman Coulter Optima XL-100K Ultracentrifuge, rotor SW41.Ti) na  $210\,000\times g$ , 3h pri  $4^{\circ}C$ . Nakon centrifugiranja na svakoj granici između različitih postotaka otopina saharoze bila su vidljiva 3 prstena. S vrha gradijenta je skupljeno dvanaest frakcija po 1 ml. Svaka frakcija je pomiješana u omjeru 1:1 s otopinom 3 mM imidazola (pH 7.4) i 1mM EDTA. Pripremljene frakcije su centrifugirane u ultracentrifugi (Beckman Coulter Optima XL-100K Ultracentrifuge, rotor 50.4 Ti) na  $100\,000\times g$ , 1h pri  $4^{\circ}C$ . Peleti dobiveni nakon ultracentrifugiranja su resuspendirani u puferu za lizu stanice - RIPA (50 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0,1% SDS, 0,5% natrijev deoksilat) s dodatkom koktela inhibitora proteaza (Complete, Roche Applied Science) i fosfataza (Roche Applied Science). Tako pripremljeni uzorci su smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na  $-80^{\circ}C$  do daljnje analize metodom Western blot.

**Tablica 6.** Sastav otopina saharoze za ultracentrifugiranje u diskontinuiranom gradijentu gustoće.

<b>% otopina saharoze</b>	<b>Sastav</b>
<b>25% otopina saharoze</b>	- 0,806 M saharoza (Alfa Aesar, ThermoFisher Scientific, SAD) - 3mM imidazol, pH 7.4 (Fluka™, Honeywell, SAD) - 1mM EDTA (Kemika, Hrvatska) - dH <sub>2</sub> O
<b>35% otopina saharoze</b>	- 1,177 M saharoza (Alfa Aesar, ThermoFisher Scientific, SAD) - 3mM imidazol, pH 7.4 (Fluka™, Honeywell, SAD) - 1mM EDTA (Kemika, Hrvatska) - dH <sub>2</sub> O
<b>62% otopina saharoze</b>	- 2,351 M saharoza (Alfa Aesar, ThermoFisher Scientific, SAD) - 3mM imidazol, pH 7.4 (Fluka™, Honeywell, SAD) - 1mM EDTA (Kemika, Hrvatska) - dH <sub>2</sub> O

### **3.6. Lipidomika**

Analizom lipidoma ispitano je postoji li razlika u raspodjeli lipidnih vrsta između hipokampusa i malog mozga i doprinosi li razlika specifičnoj regionalnoj osjetljivosti na neurodegeneraciju u bolesti NPC. Analiza lipidoma napravljena je u suradnji s kompanijom Lipotype GmbH (Dresden, Njemačka) korištenjem metode shotgun lipidomike ([www.lipotype.com](http://www.lipotype.com)). Analiza je napravljena za homogenate malog mozga i hipokampusa te frakcije ranih endosoma izoliranih iz tkiva malog mozga i hipokampusa miševa NPC1 i wt starosti 4 tjedna.

#### **3.6.1. Priprema homogenata moždanih regija za analizu lipidoma**

Uzorci malog mozga i hipokampusa 4 tjedana starih miševa NPC1 i wt pripremljeni su u triplikatima prema Lipotype protokolu. Prije homogenizacije disecirani zamrznuti dijelovi malog mozga i hipokampusa izvagani su na analitičkoj vagi te je dodan 1 ml fosfatnog pufera

(PBS, od engl. *Phosphate-Buffered Sali*) bez  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  iona (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM  $KH_2PO_4$ , 8 mM  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $dH_2O$ , pH 7.3). Tkivo je homogenizirano u staklenom homogenizatoru s po 30 udaraca i 20 puta propušteno kroz 23G iglu. Konačna koncentracija homogenata je namještena na 10 mg/ml (w:v) razrjeđenjem u PBS-u bez  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ . Pripremljeni homogenati su smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na  $-80^\circ C$  do slanja na analizu.

### 3.6.2. Priprema uzoraka ranih endosoma za analizu lipidoma

Uzorci malog mozga i hipokampusa koji su korišteni za frakcioniranje u diskontinuiranom gradijentu gustoće su homogenizirani na isti način kao što je opisano u poglavlju 3.5.1., osim što je umjesto homogenizacijskog pufera korišten PBS-a bez  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  iona. Dobiveni PNS je korišten za frakcioniranje u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze kako je opisano u poglavlju 3.5.2., uz male izmjene. Peleti frakcija 4 i 5, koje su sadržavale prsten ranih endosoma, su spojeni i resuspendirani u PBS-u bez  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  iona te dodatno 15 puta propušteni kroz 23 G iglu. Uzorci su smrznuti u tekućem dušiku i pohranjeni na  $-80^\circ C$  do slanja na analizu.

## 3.7. Analiza razine proteina metodom Western blot

### 3.7.1. Priprema staničnog lizata primarnih mišjih kortikalnih neurona

Za analizu količine supstrata BACE1 kortikalni neuroni su bili nasadjeni u plastične ploče sa 6 bunarića. Suspenzija kortikalnih neurona dobivena od jednog mladunca je podjednako podijeljena u 8 bunarića. Svi pokusi su bili rađeni u tehničkim duplikatima i validirani u 3 pokusa.

Svi koraci u pripremi staničnog lizata izvođeni su na ledu. Nakon 14 dana u kulturi medij u kojem su neuroni rasli je sakupljen u plastične mikrotubice i centrifugiran na  $2300 \times g$ , 5 min pri  $4^\circ C$  (Eppendorf 5415R, Njemačka). Supernatant je odvojen u nove plastične mikrotubice i pohranjen na  $-20^\circ C$  do analize. Stanice su 2 puta isparane u hladnom PBS pufer. Nakon zadnjeg ispiranja sav pufer je dobro i pažljivo pokupljen. Stanice su odvojene od površine plastične posude u kojoj su rasle mehničkim struganjem pomoću gumene strugalice (engl. *Policeman, cell scraper*, Sarstedt, Njemačka) u 200  $\mu l$  RIPA pufera (50 mM Tris pH 8,0,

150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0,1% SDS, 0,5% natrijev deoksilat) s dodatkom koktela inhibitora proteaza (Complete, Roche Applied Science) i inhibitora fosfataza (Roche Applied Science). Stanični lizat je prebačen u mikrotubice od 1.5 ml i inkubiran na ledu 30 min uz vorteksiranje svakih 5 min. Nakon inkubacije na ledu uzorci su centrifugirani na max. brzini 16000×g, 10 min pri 4°C (Eppendorf 5415R, Njemačka). Supernatant u kojem se nalaze stanični proteini je odvojen u nove mikrotubice od 1.5 ml i pohranjen na -20°C do analize.

### 3.7.2. Određivanje koncentracije proteina u staničnom lizatu

Koncentracija proteina u staničnim lizatima i u postnuklearnim supernatantima endolizosomalnih frakcija određena je pomoću komercijalno dostupnog kompleta Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fischer Scientific, SAD) po protokolu proizvođača. Komplet se temelji na dvije reakcije, biuretskoj reakciji gdje dolazi do redukcije bakrovih iona te detekciji iona bakra bicinkoničnom kiselinom (BCA). U plastičnim mikrotitarskim pločicama s 96 bunarića (TPP) ispipetirano je u duplikatima po 10 µl standarda ili uzorka, a zatim po 200 µl otopine reagensa iz kompleta (Pierce™ BCA reagens A: Pierce™ BCA reagens B). Mikrotitarska pločica je inkubirana 30 min na sobnoj temperaturi nakon čega je apsorbancija očitana na spektrofotometru (ThermoLab systems Multiskan EX, SAD) na valnoj duljini od 570 nm.

### 3.7.3. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Proteini u dobivenim lizatima, uzorcima medija neurona i endolizosomalnim frakcijama su razdvojeni vertikalnom denaturirajućom elektroforezom u poliakrilamidnom gelu na temelju njihove razlike u molekularnoj masi. Stanični lizati neurona i pripadajući uzorci medija neurona su normalizirani prema koncentraciji proteina i na gel je nanoseno 10 µg proteina staničnog lizata i medija. Za endolizosomalne frakcije na gel je nanosen jednak volumen svake frakcije, a volumen između uzoraka miševa NPC1 i wt je stratificiran prema količini proteina u odgovarajućem postnuklearnom supernatantu (PNS). Kao biljeg molekularne mase proteina korišten je Cozy™ Prestained Protein Ladder (highQu GmbH, Njemačka).

Stanični lizati/uzorci medija/frakcije su pomiješani s 6x koncentriranim reducirajućim puferom za nanošenje uzoraka (6ml glicerola, 1,2g SDS, 0,31 g DTT, 1,25 ml 0,5 M pufera Tris pH 6,8, boja bromfenol modro, dH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena 10 ml) ili 6x koncentriranim

nereducirajućim puferom za nanošenje uzoraka (6ml glicerola, 1,2g SDS, 1,25 ml 0,5 M pufera Tris pH 6,8, boja bromfenol modro, dH<sub>2</sub>O do ukupnog volumena 10 ml), ovisno o svojstvima antitijela koja su kasnije analizirana. Tako pripremljeni uzorci su denaturirani pri 70°C , 10 min u termobloku, centrifugirani pri sobnoj temperaturi 1 min na 20000×g, (Eppendorf 5424, Njemačka), i naneseni na gel. Proteini su razdvojeni elektroforezom koristeći komercijalni sustav za vertikalnu elektroforezu Mini-PROTEAN (BioRad, SAD) u Tris-glicin gelu u denaturirajućim uvjetima (Tablica 7.) pri konstantnom naponu od 100 V dok uzorci nisu prešli u gel za razdvajanje nakon čega je napon povećan na 150 V. Svi gelovi su se sastojali od gela za sabijanje i gela za razdvajanje proteina. Sastav gelova te pufera za elektroforezu se nalazi u Tablicama 7 i 8.

**Tablica 7.** Sastav Tris-glicin poliakrilamid gelova za razdvajanje i sabijanje (10 ml) te pufera za elektroforezu.

	Gel za razdvajanje (ml)				Gel za sabijanje (ml)
	6 % gel	8 % gel	12% gel	15 % gel	5% gel
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	5,4	4,7	3,4	2,4	6,9
<b>30 % otopina akrilamida i bisakrilamida (29:1)</b>	2,0	2,7	4,0	5,0	1,7
<b>1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)</b>	2,5	2,5	2,5	2,5	-
<b>1 M Tris- HCl (pH 6,8)</b>	-	-	-	-	1,25
<b>10 % APS</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>TEMED</b>	0,008	0,006	0,004	0,004	0,01
Pufer za elektroforezu: 25 mM Tris, 192 mM glicin, 0.1% SDS, pH 8.3					



**Tablica 8.** Sastav peptidnog Tris-tricin gela (volumen za dva 1.5 mm gela) te katodnog i anodnog pufera za elektroforezu.

	Diskontinuirani gradijentni gel za razdvajanje (ml)		Gel za sabijanje (ml)
	10 % gel	16.5% gel	4 % gel
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	3,5	/	4,2
<b>Peptidni pufer (3 M Tris-HCl pH 8,45, 0,3% SDS)</b>	3,5	3,5 ml	1,55
<b>32% glicerol</b>	/	3,5 ml	/
<b>49,5% otopina akrilamida i bisakrilamida (48,5 : 1,5)</b>	1,5	3,5 ml	0,5 ml
<b>10 % APS</b>	0,035	0,0325	0,05
<b>TEMED</b>	0,004	0,004	0,005
Katodni pufer: 0,1 M Tris-HCl, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS Anodni pufer: 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9			

#### 3.7.4. Prijenos proteina na membranu

Proteini razdvojeni elektroforezom u poliakrilamidnom gelu su preneseni na polivinilnu membranu (PVDF, Roche Diagnostics GmbH, Njemačka) pomoću sustava Mini-PROTEAN. Prijenos proteina se odvijao pri konstantnoj jakosti struje 100 mA, u puferu za prijenos (25 mM Tris, 192 mM glicin, 20% metanol, pH 8,4) preko noći pri 4°C ili pri konstantnoj jakosti struje 200 mA, 3h na sobnoj temperaturi.

#### 3.7.5. Bojanje membrane metodom Amido Black

Za provjeru uspješnosti prijenosa i ujednačenog nanošenja proteina na gel membrana je obojana metodom Amido Black. Nakon prijenosa membrana je isprana u PBS-u 10 min uz lagano njihanje te stavljena 2 min u otopinu za bojanje (0,1% (m/V) Amido Black 10B (Merck Milipore, SAD), 20% metanol, 2% octena kiselina, dH<sub>2</sub>O). Odbojavana je dva puta po 30 min u otopini za odbojavanje (45% metanol, 7% octena kiselina, dH<sub>2</sub>O) na horizontalnoj miješalici

te isprana u reH<sub>2</sub>O. Na kraju membrane je isprana u puferu za ispiranje TBST (od engl. *Tris-Buffered Saline*; 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, i 0,1% Tween-20).

### 3.7.6. Vežanje antitijela na membranu

Prije inkubacije s antitijelima membrana je blokirana kako bi se zasitila sva prazna vezna mjesta na membrani i kako bi se spriječilo nespecifično vežanje antitijela za membranu. Membrana je inkubirana 55 min u 5% otopini reagensa I-Block (Tropix, Thermo Fisher Scientific, SAD) u PBS-u. Membrana je inkubirana s željenim primarnim antitijelom razrijeđenim u otopini za blokiranje preko noći na tresilici (UltraRocker Rocking Platform, BioRad, SAD) ili na *roller* miješalici (Scilogex MX-T-6S, Scilogex, SAD), pri 4°C. Korištena primarna antitijela i njihova razrjeđenja su navedena u Tablici 9. Nakon prekonnočne inkubacije s primarnim antitijelom membrana je isprana tri puta po 10 min u puferu za ispiranje TBST te inkubirana 90 min u otopini odgovarajućeg sekundarnog antitijela konjugiranog s peroksidazom hrena (1:5000 v/v) uz stalno njihanje pri sobnoj temperaturi. Korištena su sekundarna antitijela proizvedena protiv miša, kunića (BioRad, SAD) i štakora (Sigma-Aldrich, SAD). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitijelom membrane je isprana tri puta po 10 min u puferu TBST.

**Tablica 9.** Popis korištenih antitijela i razrjeđenje za pojedinu metodu.

<b>Antitijelo</b>	<b>Antigen/organel</b>	<b>WB</b>	<b>ICC/IHC</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>Sez6</b>	Sez6	1:1000	1:100	dar dr. Lictenthalera
<b>Sez6L</b>	Sez6L	1:10	1:10	dar dr. Lictenthalera
<b>22C11 (APP)</b>	N-terminalni kraj APP-a	1:1000	/	CHEMICON
<b>EEA1</b>	rani endosomi	1:1000	1:100	Cell signaling
<b>LAMP1</b>	lizosomi	1:1000	/	Sigma
<b>LAMP1</b>	lizosomi	/	1:100	SANTA CRUZ
<b>Rab7</b>	kasni endosomi	1:1000	/	Abcam
<b>BACE1</b>	BACE1	1:1000	/	EPITOMICS
<b>NPC1</b>	NPC1	1:1000	/	ABCAM

<b>Tuj1</b>	neuronalni biljeg	/	1:150000	COVANCE
<b><math>\beta</math>III tubulin</b>	neuronalni biljeg	1:2000	/	ABCAM
<b>Y188 (APP)</b>	C-terminalni kraj APP-a	/	1:100	EPITOMICS; ABCAM
<b>Total Tau</b>	ukupan tau protein	1:5000	1:1000	DAKO
<b>PHF1 (pSer396/pSer404)</b>	fosforilirani tau protein	1:1000	1:1000	dar dr. Davies
<b>CD68</b>	biljeg aktiviranih mikroglia i makrofaga	/	1:750	BIORAD
<b>GFAP</b>	astrocitni biljeg	/	1:500	Cell signaling

### 3.7.7. Detekcija proteina na membrani kemiluminiscencijom

Proteinske vrpce obilježene specifičnim antitijelima detektirane su kemiluminiscencijom pomoću komercijalno dostupnog kompleta *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (ThermoFisher Scientific, SAD). Reagens je pripremljen prema uputama proizvođača. Signal s membrane je detektirani i analiziran na uređaju Uvitec Alliance 4.7 (Uvitec Cambridge, UK). Dobiveni signali kemiluminiscencije su kvantitativno analizirani u računalnom programu ImageJ (NIH, SAD).

## 3.8. Analiza smještaja proteina imunofluorescencijom

Smještaj proteina u mišjim primarnim hipokampalnim neuronima i u organotipskim rezovima mozga detektiran je imunofluorescencijom i analiziran konfokalnim laserskim mikroskopom Leica SP8 X FLIM u Zavodu za molekularnu biologiju, IRB. Slike su analizirane u računalnom programu LAS X (Leica, Njemačka).

### 3.8.1. Imunocitokemijska analiza

Imunocitokemijska analiza smještaja supstrata BACE1 i biljega endolizosomalnog puta te njihova kolokalizacija provedena je u netretiranim mišjim primarnim hipokampalnim neuronima i u mišjim primarnim hipokampalnim neuronima tretiranim inhibitorom proteaze BACE1-C3.

U organotipskim rezovima mozga imunohistokemijskom analizom je praćena neuroinflamacija, jedna od patoloških karakteristika bolesti NPC, u netretiranim i u organotipskim rezovima mozga tretiranim inhibitorom proteaze BACE1-C3.

#### 3.8.1.1. Imunocitokemijska analiza primarnih mišjih neurona

Za imunocitokemijsku analizu primarni hipokampalni neuroni su rasli na stakalcima smještenim u plastičnim pločama sa šest bunarića. Nakon završetka pokusa, uklonjen je medij i stanice su fiksirane u otopini 4% paraformaldehida u 4% otopini saharoze 15 min pri sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije neuroni su tri puta isprani u PBS-u i inkubirani u 50 mM otopini  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 min, pri sobnoj temperaturi kako bi se spriječila potencijalna nespecifična pozadinska fluorescencija samog fiksativa. Neuroni su tri puta isprani u PBS-u te permeabilizirani u 0,1% otopini Triton X-100 u PBS-u 3 min. Zatim su neuroni ponovno isprani tri puta u PBS-u te inkubirani 1h, pri sobnoj temperaturi u otopini za blokiranje koja sadrži 4% magarećeg seruma (Sigma-Aldrich, SAD). Nakon blokiranja stanice su inkubirane u otopini primarnih antitijela razrijeđenima u otopini za blokiranje, u vlažnoj komori. Vlažna komora je napravljena od zatamnjene posude u kojoj se nalazio vlažan papir (Whatman, Sigma-Aldrich, SAD) na koji je stavljen parafilm (Brand GmbH, Njemačka) te ispipetirana otopina primarnih antitijela (razrijeđenja antitijela se nalaze u Tablici 9.). Svako stakalce je pažljivo pincetom prebaćeno iz bunarića na ispipetiranu otopinu primarnih antitijela okrenuto tako da stanice budu uronjene u otopinu primarnih antitijela. Stakalca su inkubirana s primarnim antitijelom preko noći pri 4°C. Sljedeći dan stakalca su isprana tri puta u PBS-u i zatim inkubirana u otopini filipina i sekundarnog antitijela konjugiranog s fluorokromom razrijeđenog (1:500 v/v) u otopini za blokiranje. Bojanje filipinom je opisano u poglavlju 3.9.2. Inkubacija u otopini sekundarnog antitijela se također odvijala u tamnoj, vlažnoj komori 1h pri sobnoj temperaturi. Korištena su sekundarna antitijela iz magarca protiv IgG kunića obilježena AlexaFluor-488, miša obilježena AlexaFluor-594 i štakora obilježena AlexaFluor-488 (Invitrogen, SAD). Nakon inkubacije sa sekundarnim antitijelom stakalca su isprana tri puta u PBS-u i dva puta u mQ-H<sub>2</sub>O. Na kraju su stakalca sa stanicama uklopljena na predmetna stakalca (VWR, SAD) koristeći medij za uklapanje Fluoromount (Sigma-Aldrich, SAD). Imunocitokemijsko bojenje analizirano je na konfokalnom laserskom mikroskopu Leica SP8 X FLIM (Zavod za molekularnu biologiju, IRB).

### 3.8.2. Imunohistokemija organotipskih rezova mišjih mozgova

Za analizu neuropatoloških karakteristika i utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na te patološke karakteristike organotipski rezovi mozga su uzgajani na poroznim politetrafluoroetilen (PTFE) membranskim umetacima (PICM ORG 050, Millipore) umetnutim u bunariće ploče sa šest bunarića. Nakon završetka pokusa, uklonjen je medij, a rezovi su fiksirani u otopini 4% paraformaldehida u 4% otopini saharoze 15 min pri sobnoj temperaturi. Nakon fiksacije isprani su tri puta u PBS-u. Rezovi su prvo pažljivo izrezani sa nosača i zajedno s membranom na kojoj su rasli prebačeni u plastične ploče s 24 bunarića (Sigma-Aldrich, SAD) u otopinu PBS-a. Uzorci su permeabilizirani u PBST-u (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5%, Triton X-100 (Sigma-Aldrich, SAD) 30 min na sobnoj temperaturi. Nakon permeabilizacije svi postupci su rađeni u mračnoj i vlažnoj kutiji pri sobnoj temperaturi. Blokiranje se odvijalo u 4% otopini magarećeg seruma tijekom 1 h. Potom su uzorci inkubirani s primarnim antitijelom razrijeđenim u otopini za blokiranje (Tablica 9.) preko noći. Sutradan su uzorci isprani tri puta u PBST-u, nakon čega su inkubirani sa sekundarnim antitijelom razrijeđenim u otopini za blokiranje (1:250 v/v), 3h pri sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitijelom uzorci su isprani tri puta u PBST-u, a zatim dva puta u mQ-H<sub>2</sub>O kako bi se u potpunosti isprale soli zaostale od PBST pufera. Pripremljena su predmetna stakalca (VWR, SAD) na kojima je pastom (Relief Paste, Marabu, Njemačka) napravljen okvir. U sredinu napravljenog okvira je prenesen rez na membrani te je uklopljen u medij za uklapanje (Fluoromount, Sigma-Aldrich), poklopljen pokrovnicom (Paul Marienfeld GmbH, Njemačka) i analiziran na konfokalnom mikroskopu Leica SP8 X FLIM (Zavod za molekularnu biologiju, IRB).

## 3.9. Analiza razine i unutarstaničnog nakupljanja kolesterola

### 3.9.1. Određivanje razine kolesterola u endolizosomskim frakcijama moždanih regija

Ukupna razina slobodnog kolesterola u pojedinim endolizosomskim frakcijama, dobivenim frakcioniranjem u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze (poglavlje 3.5.2.) je izmjerena pomoću komercijalno dostupnog seta Amplex Red Cholesterol Assay (Invitrogen, SAD). Ovaj set se temelji na nekoliko enzimskih reakcija te omogućuje detekciju i slobodnog kolesterola i kolesterol-estera jer u reakciji sudjeluje kolesterol esteraza koja hidrolizira

kolesterol-estere do slobodnog kolesterola. Oksidacijom slobodnog kolesterola, kolesterol oksidazom dolazi do oslobađanja vodikovog peroksida. Vodikov peroksid, pomoću enzima peroksidaze, stehiometrijski 1:1 reagira s reagensom „Amplex Red“ pri čemu nastaje fluorescentni spoj resofurin koji se pobuđuje i čija se emisija očitava na fluorimetru (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific, SAD). Standardna razrjeđenja su pripremljena razrjeđivanjem liofiliziranog kolesterola (standard dostupan u setu) u rasponu koncentracije od 0-10 µg/mL iz čega je definirana standardna krivulja. Budući da je reagens Amplex Red osjetljiv na svjetlost, korištene su crne mikrotitarske pločice (ThermoFischer Scientific, SAD). U crnoj pločici s 96 bunarića pomiješano je 50 µl standarda ili uzorka (endolizosomskih frakcija) s 50 µl reakcijske smjese prema uputama proizvođača. Pločica je inkubirana 45 min pri 37°C nakon čega je fluorescencija mjerena pobuđivanjem pri 530 nm i detekcijom pri 590 nm u fluorometru (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Fisher Scientific). Koncentracija kolesterola u endolizosomskim frakcijama u µg/ml izračunata je pomoću standardne krivulje. Količina kolesterola u endolizosomskim frakcijama definirana je kao omjer koncentracije kolesterola i koncentracije proteina u pojedinoj frakciji. Konačna količina kolesterola izražena je kao µg kolesterola/mg proteina za svaku frakciju.

### 3.9.2. Imunocitokemijska analiza nakupljanja slobodnog neesterificiranog kolesterola u primarnim neuronima

Nakupljanje slobodnog neesterificiranog kolesterola je analizirano bojanjem otopinom filipina. Filipin je antibiotik izoliran iz *Streptomyces filipiensis* (Sigma-Aldrich, SAD) koji ima svojstvo fluorescencije i veže se na slobodni kolesterol. Obilježavanje stanica filipinom se odvijalo zajedno s inkubacijom u sekundarnom antitijelu. Finalna koncentracija filipina u otopini je bila 100 µg/mL a bojanje je analizirano na konfokalnom mikroskopu pri ekscitaciji 360 nm i emisiji 465 nm.

### 3.10. Kvantifikacija i statistička obrada podataka

Obilježene proteinske vrpce dobivene metodom Western blot kvantificirane su u programu Image J (NIH, SAD). Rezultati dobiveni imunocitokemijom i imunohistokemijom uređeni su u računalnom programu LAS X (Leica Microsystems). Imunocitokemijske i imunohistokemijske slike su kvantificirane u programu Image J (NIH, SAD).

Statistička obrada podataka napravljena je u programu GraphPad Prism 8 (La Jolla California, USA). Prije statističke obrade, Shapiro-Wilk testom je provjerena normalna raspodjela podataka. Za obradu podataka koji su pokazali normalnu raspodjelu korišteni su parametrijski testovi. Studentov *t*-test korišten je za određivanje statističke razlike između srednjih vrijednosti dviju nezavisnih grupa. Za određivanje statističke značajnosti između srednjih vrijednosti tri ili više grupa korištena je jednosmjerna ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom kojom je ustanovljeno gdje postoje razlike između grupa. Statistička značajnost testova postavljena je na  $p < 0,05$ . Za podatke koji nisu pratili normalnu raspodjelu korišten je neparametrijski Kruskal-Wallis test, a Dunn's *post hoc* testom su istražene statistički značajne razlike između tri ili više grupa, pri čemu je statistička značajnost testova postavljena na  $p < 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakterizacija primarnih kultura neurona mišjeg modela bolesti NPC1

Naši nedavni rezultati na staničnom NPC1-null modelu kao i u mozgovima NPC1 mutiranih miševa su uputili na povećano cijepanje supstrata proteazom BACE1 ( $\beta$ -sekretazom) (Malnar i sur., 2010; Causevic i sur., 2018), središnjim enzimom u stvaranju peptida amiloid-beta ( $A\beta$ ) koji se karakteristično nakupljaju u mozgovima Alzheimer pacijenata. Kako bismo razjasnili molekularne detalje uočenog učinka analizirali smo primarne kulture neurona izolirane iz NPC1 mutiranog mišjeg modela (u daljnjem tekstu NPC1) koji uslijed spontane mutacije ne sintetizira protein NPC1 u odnosu na iste kulture miševa divljeg tipa (u daljnjem tekstu, wt od engl. *wild-type*). Iako je u bolesti NPC primarno zahvaćen mali mozak, Purkinjeovi neuroni nisu analizirani zbog malog prinosa prilikom izolacije i nemogućnosti pouzdane analize. Stoga su korišteni kortikalni i hipokampalni neuroni koji u kori velikog mozga također pokazuju naknadno odumiranje dok se hipokampus smatra najmanje pogođen. Pri tom je bitno napomenuti da je bez obzira na različitu vulnerabilnost neurona, u mozgovima miševa NPC1 utvrđena povećana proteoliza enzimom BACE1 u sve tri regije (malom mozgu, hipokampusu i korteksu) i to već u asimptomatskoj fazi bolesti NPC1 pri starosti miševa od 4 tjedna (Causevic i sur. 2018), ukazujući da bi molekularni putevi koji dovode do uočenog defekta proteaze BACE1 mogli biti podjednaki u neuronima iz sve tri regije.

Za uspostavu primarnih kultura mišjih neurona korišteni su mladunci postnatalnog dana 0-1 (P0-P1) (opisano u poglavlju 3.2.1). Iz svakog pojedinačnog mladunca istovremeno su izolirani kortikalni i hipokampalni neuroni. S obzirom da miševi NPC1 nisu fertilni za dobivanje mladunaca P0-1 bilo je potrebno pariti NPC1-heterozigote i dobivene mladunce genotipizirati kako bi se utvrdile primarne kulture neurona miševa NPC1 i wt. Miševi su genotipizirani metodom lančane reakcije polimeraze (PCR, Slika 8. A). Osim na razini DNA, metodom Western blot je provjerena i razina proteina NPC1 u primarnim kortikalnim neuronima. U neuronima izoliranim iz miševa NPC1 nije bilo moguće detektirati protein NPC1, čime je dodatno potvrđen genotip (Slika 8. B).

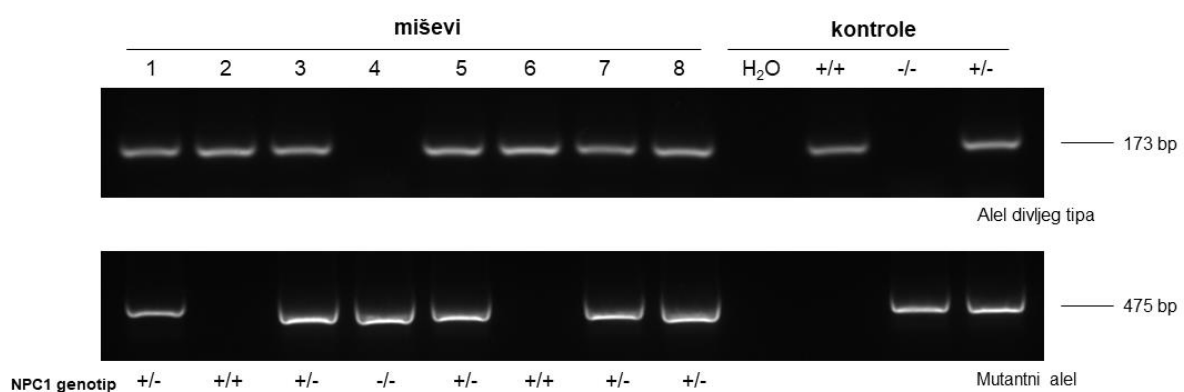
Nakupljanje slobodnog kolesterola i drugih lipida u kasnim endosomima/lizosomima jedna je od glavnih obilježja bolesti NPC. U primarnim hipokampalnim neuronima imunocitokemijskom i kvantitativnom analizom dobivenog signala biljega lizosoma-LAMP1 (od engl. *lysosomal associated membrane protein 1*) pokazano je da neuroni NPC1 imaju



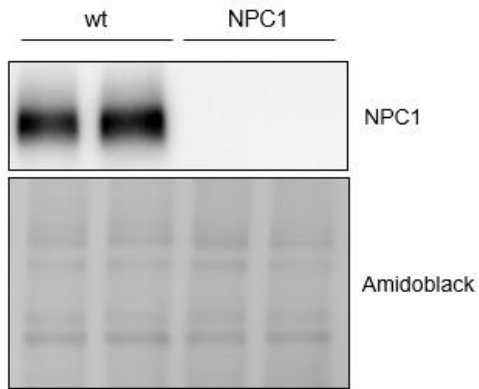
povećane lizosome u somi u odnosu na neurone wt (Slika 8. C i D). Usporedno je analizirano i bojanje neurona filipinom, fluorescentnim antibiotikom koji veže slobodni kolesterol, koje je pokazalo da u neuronima NPC1 dolazi do nakupljanja slobodnog kolesterola u povećanim lizosomima u somi neurona. Takvo nakupljanje slobodnog kolesterola nije uočeno u wt neuronima gdje je signal raspršen po čitavoj stanici (Slika 8. C). Ovaj rezultat je utvrdio da primarni hipokampalni neuroni izolirani iz miševa NPC1, iako ne pokazuju značajnu vulnerabilnost u bolesti NPC, posjeduju dva karakteristična ključna patološka obilježja bolesti NPC: povećane lizosome i nakupljanje slobodnog kolesterola u lizosomima. Također, analizirana je morfologija neurita bojanjem neurona neuro-specifičnim antitijelom za  $\beta$ -tubulin (TUJ1) koje nije pokazalo razliku u morfologiji neurita između hipokampalnih neurona miševa NPC1 i wt.

Hiperfosforilacija proteina tau također je jedno od obilježja bolesti NPC. U primarnim kortikalnim neuronima metodom Western blot pokazano je da su razine ukupnog proteina tau (total tau) te hiperfosforiliranog oblika proteina tau (PHF1) povećane u neuronima NPC1 u odnosu na neurone wt, no detektirano povećanje je bilo statistčki značajno samo za ukupnu razinu proteina tau (Slika 8. E i F). Sumarno, pokazali smo da uspostavljena primarna kultura neurona NPC1 pokazuje ključne patološke karakteristike bolesti NPC: nakupljanje slobodnog kolesterola u lizosomima te povećanu razinu ukupnog i hiperfosforiliranog proteina tau.

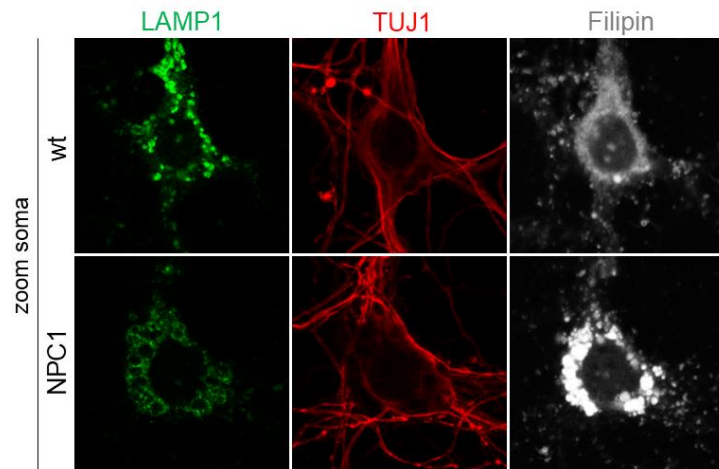
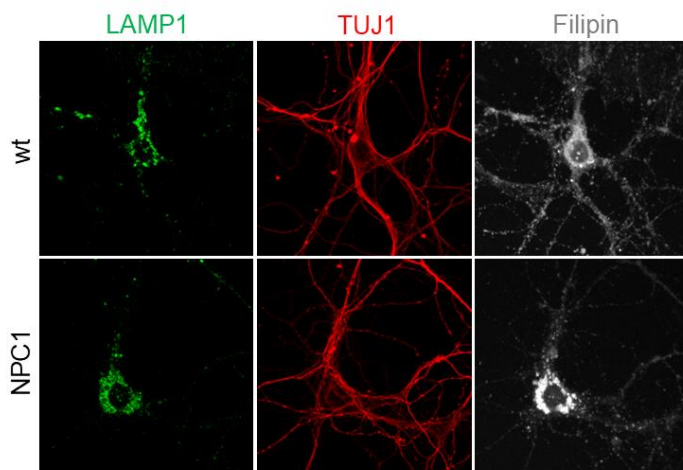
A)



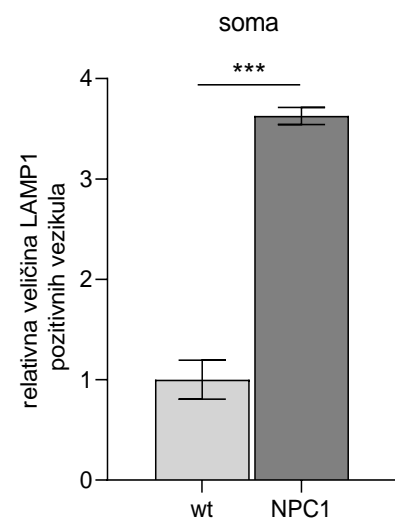
**B)**

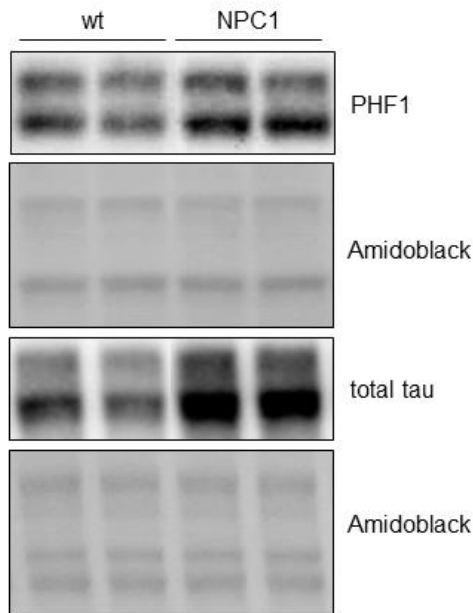
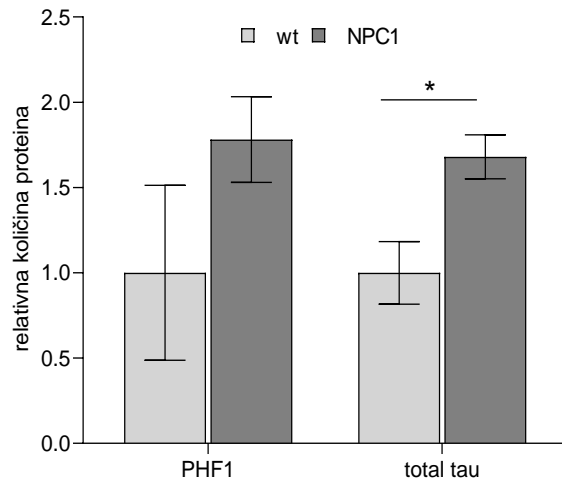


**C)**



**D)**



**E)****F)**

**Slika 8. Primarne kulture neurona mišjeg modela bolesti NPC pokazuje patološke karakteristike bolesti NPC.** A) Genotip miševa određen je metodom PCR - umnažanjem gena *NPC1*. Dobivene DNA vrpce su vizualizirane elektroforezom u agaroznom gelu. B) Razina proteina NPC1 provjerena je metodom Western blot. C) Imunocitokemijom i konfokalnom laserskom mikroskopijom analizirani su biljezi lizosoma-LAMP1 i aksona-TUJ1 te slobodni kolesterol (bojenje filipinom). D) Veličina LAMP1 pozitivnih vezikula u somi primarnih hipokampalnih neurona wt i NPC1 kvantificirana je u programu ImageJ. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD, n= 30 stanica po grupi iz 3 nezavisna pokusa. Statistička značajnost je izračunata *t*-testom, \*\*\* $p < 0,001$ . E) Analiza razine hiperfosforiliranog i ukupnog proteina tau metodom Western blot. F) Rezultati dobiveni metodom Western blot kvantificirani su programom ImageJ i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom. Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Statistička značajnost je izračunata *t*-testom, \* $p < 0,05$ .

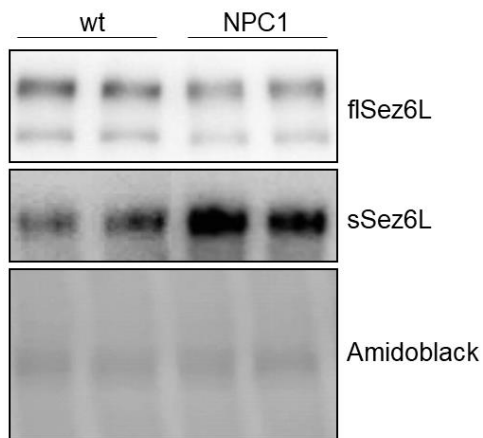
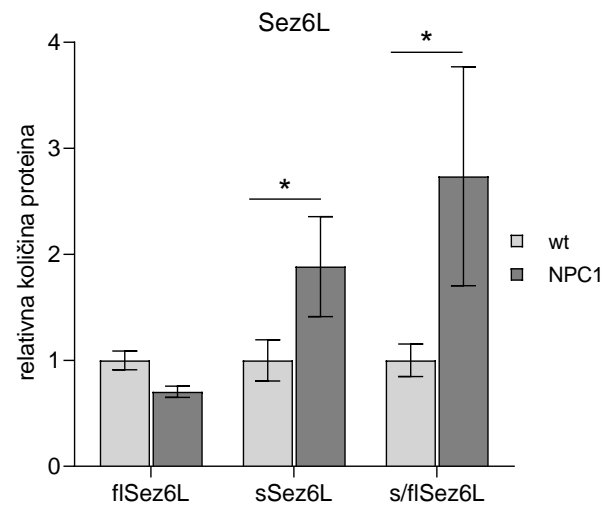
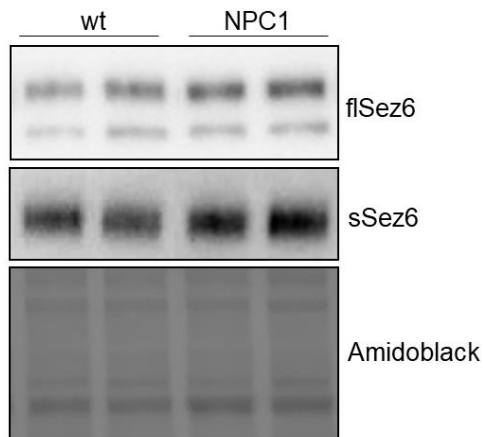
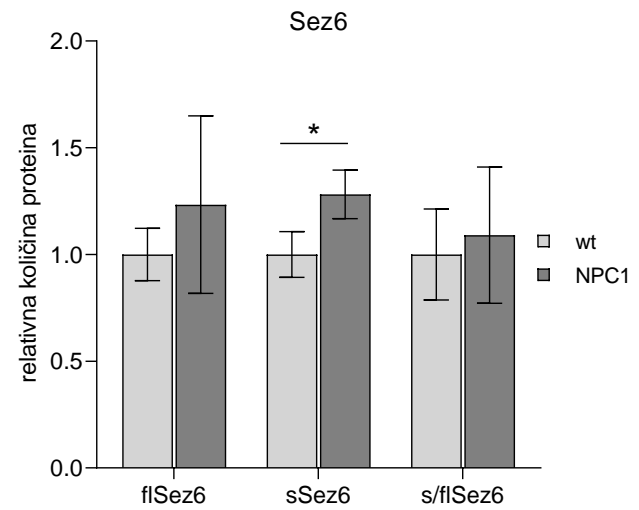
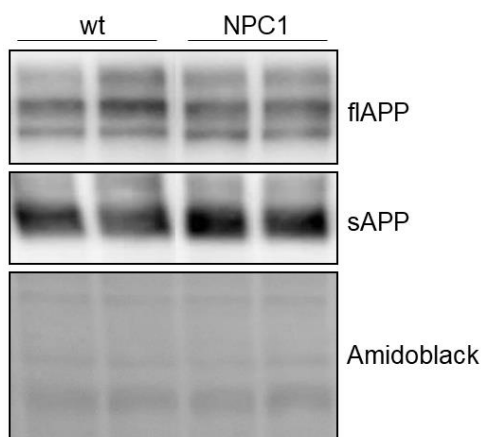
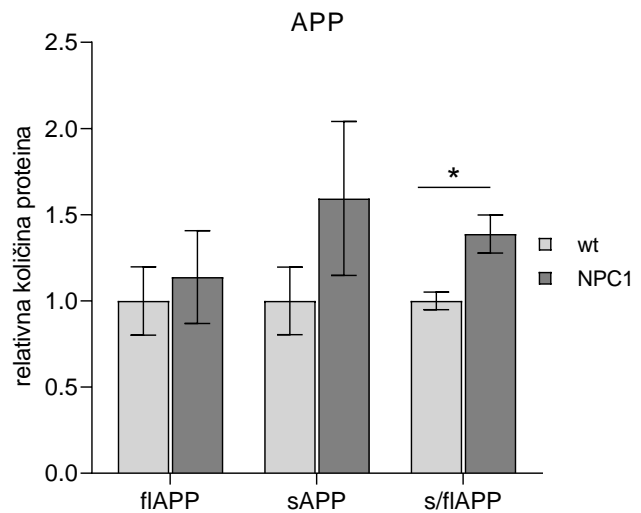
#### 4.2. Analiza supstrata proteaze BACE1 u primarnim kulturama neurona mišjeg modela bolesti NPC

U primarnim kulturama neurona miševa NPC1 i wt praćena je razina i smještaj supstrata enzima BACE1, proteina Sez6L i Sez6, koji predstavljaju supstrate koji se isključivo i/ili preferirano cijepaju enzimom BACE1, kao i protein APP, koji se karakteristično cijepa u AB. Kortikalni neuroni korišteni su za analizu razine proteina metodom Western blot, dok su hipokampalni neuroni analizirani metodom imunocitokemije.

#### 4.2.1. Analiza proteolize supstrata enzima BACE1 u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 i wt

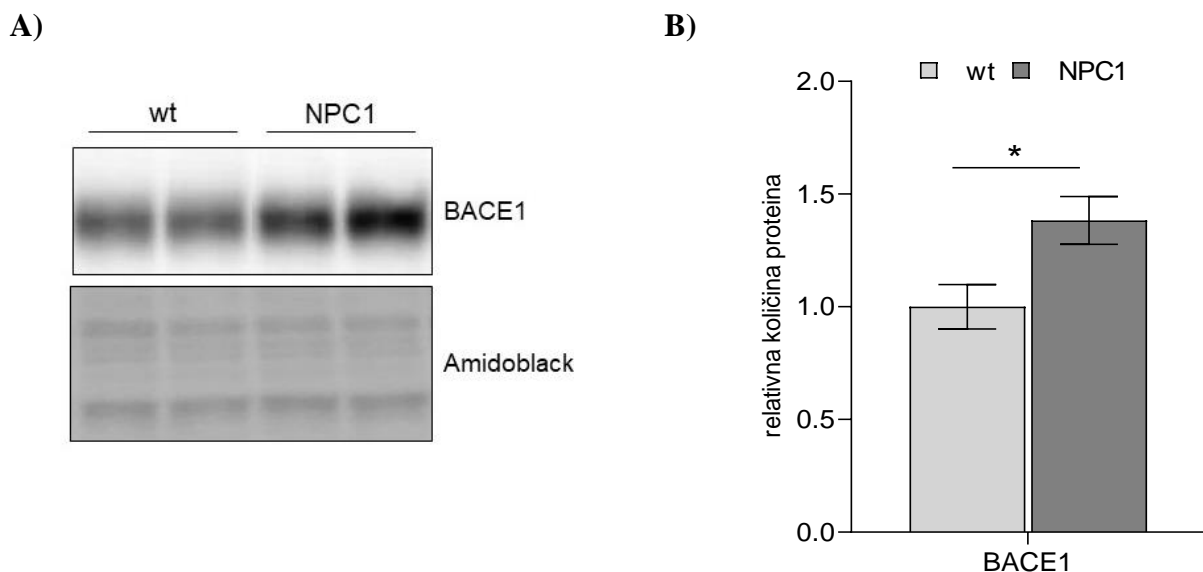
Za ispitivanje proteolize supstrata BACE1 -Sez6L, Sez6 i APP u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 i wt praćena je metodom Western blot razina nepocijepanih proteina (fl, od engl. *full length*) u staničnim lizatima te razina pocijepanih i izlučenih N-terminalnih odsječaka nastalih cijepanjem proteazom BACE1 (s, od engl. *soluble*) u mediju. Omjer razine izlučenih (s) odsječaka analiziranih supstrata u odnosu na razine nepocijepanih proteina (fl) predstavljao je mjeru učinkovitosti cijepanja analiziranog supstrata enzimom BACE1.

Analiza razine nepocijepanih proteina Sez6L (flSez6L), Sez6 (flSez6) i APP (flAPP) u staničnim lizatima kortikalnih neurona uzgajanih u kulturi 14 dana, pokazala je da je razina proteina flSez6L neznatno smanjena u neuronima miševa NPC1 u odnosu na wt, dok su razine proteina flSez6 i flAPP podjednake (Slika 9. A-C), te da ne postoji značajna razlika u razini sva tri analizirana proteina u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 u odnosu na wt (Slika 9. D-F). Western blot analiza razine izlučenih odsječaka (sSez6L, sSez6, sAPP) ovih supstrata, u mediju u kojem su neuroni uzgajani pokazala je povišenu razinu za sva tri supstrata - (Slika 9. A-C). Dok su povišene razine odsječaka sSez6L i sSez6 u mediju primarnih kortikalnih neurona miševa NPC1 u usporedbi s razinama u mediju neurona miševa wt statistički značajne, razina sAPP, iako je povišena u miševima NPC1, nije pokazala statističku značajnost (Slika 9. D-F). Važno je napomenuti kako je za detekciju izlučenih odsječaka proteina APP korišteno antitijelo koje detektira ukupnu razinu izlučenih odsječaka proteina APP usljed djelovanja  $\alpha$  - i  $\beta$ -sekretaze. Naime, zbog niske koncentracije i/ili nedovoljne osjetljivosti antitijela anti-sAPP $\beta$  (Covance) u mediju primarnih kortikalnih neurona nije bilo moguće utvrditi razinu izlučenih, topljivih odsječaka sAPP $\beta$ . Nadalje, analiza omjera izlučenih topljivih odsječaka nastalih usljed cijepanja proteazom BACE1 u odnosu na razinu nepocijepanih proteina je utvrdila značajno povećanje omjera sSez6L/flSez6L i sAPP/flAPP u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 u odnosu na omjer u mediju neurona miševa wt dok omjer sSez6/flSez6 nije pokazao statistički značajno povećanje (Slika 9. D-F). Sumarno, ovi rezultati su uputili na povišenu proteolizu analiziranih supstrata proteazom BACE1 u neuronima NPC1 te su u skladu s rezultatima dobivenim na mozgovima miševa NPC1.

**A)****D)****B)****E)****C)****F)**

**Slika 9. Proteoliza supstrata enzima BACE1 u primarnim kortikalnim neuronima miševa wt i NPC1.** Primarni kortikalni neuroni izolirani su iz mladunaca postanalnog dana 0-1 (P0-P1) i uzgajani u kulturi 14 dana. Nakon toga su pripremljeni stanični lizati i medij analizirani metodom Western blot. A-C) Razina proteina Sez6L, Sez6, APP u staničnom lizatu (flSez6L, flSez6, flAPP) i mediju (sSez6L, sSez6, sAPP) analizirana je metodom Western blot koristeći specifična antitijela. D-F) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa kvantificirani su programom Image J i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom, te su statistički obrađeni. Statistička značajnost izračunata je *t*-testom: \**p*<0,05. Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost ± SD.

Osim analize cijepanja supstrata enzimom BACE1 u primarnim kortikalnim neuronima, određena je i razina proteina BACE1. Metodom Western blot pokazano je da je razina proteina BACE1 značajno povišena u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 u odnosu na wt, ukazujući da povećana proteoliza supstrata BACE1 može biti posljedica povećane razine proteina BACE1 (Slika 10.).



**Slika 10. Razina proteina BACE1 je značajno povišena u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 u odnosu na miševe wt.** Primarni kortikalni neuroni su izolirani iz mladunaca postanalnog dana 0-1 (P0-P1), uzgajani su u kulturi 14 dana. Pripremljeni stanični lizati analizirani su metodom Western blot. A) Razina proteina BACE1 analizirana je metodom Western blot koristeći specifična antitijela. B) Rezultati dobiveni metodom Western blot kvantificirani su programom Image J i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom, te su statistički obrađeni. Statistička značajnost izračunata je *t*-testom: \**p*<0,05. Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost ± SD.

#### 4.2.2. Analiza unutarstaničnog smještaja supstrata proteaze BACE1 u primarnim kulturama hipokampalnih neurona miševa NPC1 i wt

Nadalje, ispitali smo je li povećana proteoliza supstrata enzima BACE1 u NPC1 u odnosu na wt neurone posljedica promijenjenog unutarstaničnog smještaja ovih supstrata i njihovog nakupljanja u ranim endosomima – središnjem mjestu cijepanja enzima BACE1. Naime, naša prijašnja istraživanja na staničnom modelu bolesti NPC (CHO *NPC1*-null stanicama) su pokazala da dolazi do promjenjenog transporta i smještaja proteina APP i BACE1 u ranim i reciklirajućim endosomima što vjerojatno dovodi do povećanog cijepanja proteina APP protezom BACE1 (Malnar i sur.; 2010, Malnar i sur. 2012). Stoga smo u primarnoj kulturi hipokampalnih neurona izoliranih iz mladunaca miševa NPC1 i wt postnatalnog dana 0-1 (P0-P1) ispitali unutarstanični smještaj supstrata enzima BACE1 - proteina Sez6L i Sez6, koji su kao i APP pokazali povećano cijepanje enzimom BACE1 u mozgovima NPC1 miševa (Čaušević i sur., 2018) i u primarnoj kulturi neurona miševa NPC1 (Slika 9). U neuronima miševa wt i NPC1 imunosignal Sez6L je prisutan u somi i izdancima neurona. Međutim, dok je signal za protein Sez6L u neuronima wt difuzan, u neuronima miševa NPC1 signal je točkast, posebice u neuritima gdje je uočeni signal jači i u većim nakupinama. Također, i u somi neurona miševa NPC1 signal za protein Sez6L je prisutan u većim nakupinama (Slika 11. A). Slično kao i Sez6L supstrat Sez6 je pokazao drugačije obojenje u NPC1 u odnosu na wt neurone. U neuronima miševa NPC1 uočeni su jači Sez6 signal u manjim nakupinama u somi i u izdancima, dok je u neuronima miševa wt ovaj signal difuzan (Slika 11. B).

Analiza kolokalizacije proteina Sez6L/Sez6 i bijega ranih endosoma (EEA1, od engl. *early endosome antigen 1*) - vezikulama koje imaju optimalni pH za aktivnost proteaze BACE1, pokazala je promijenjen smještaj ovih supstrata u ranim endosomima u NPC1 u odnosu na wt neurone. U somi hipokampalnih wt neurona protein Sez6L nije pokazao kolokalizaciju s vezikulama pozitivnima na EEA1, dok je u neuritima ova kolokalizacija bila djelomična. U neuritima hipokampalnih neurona miševa NPC1 primjećeno je nakupljanje većeg broja i većih vezikula pozitivnih na Sez6L i EEA1. U usporedbi s neuronima miševa wt u hipokampalnih neurona miševa NPC1, utvrđena je povećana kolokalizacija proteina Sez6L s vezikulama pozitivnima na EEA1, posebice u neuritima (Slika 11. A).

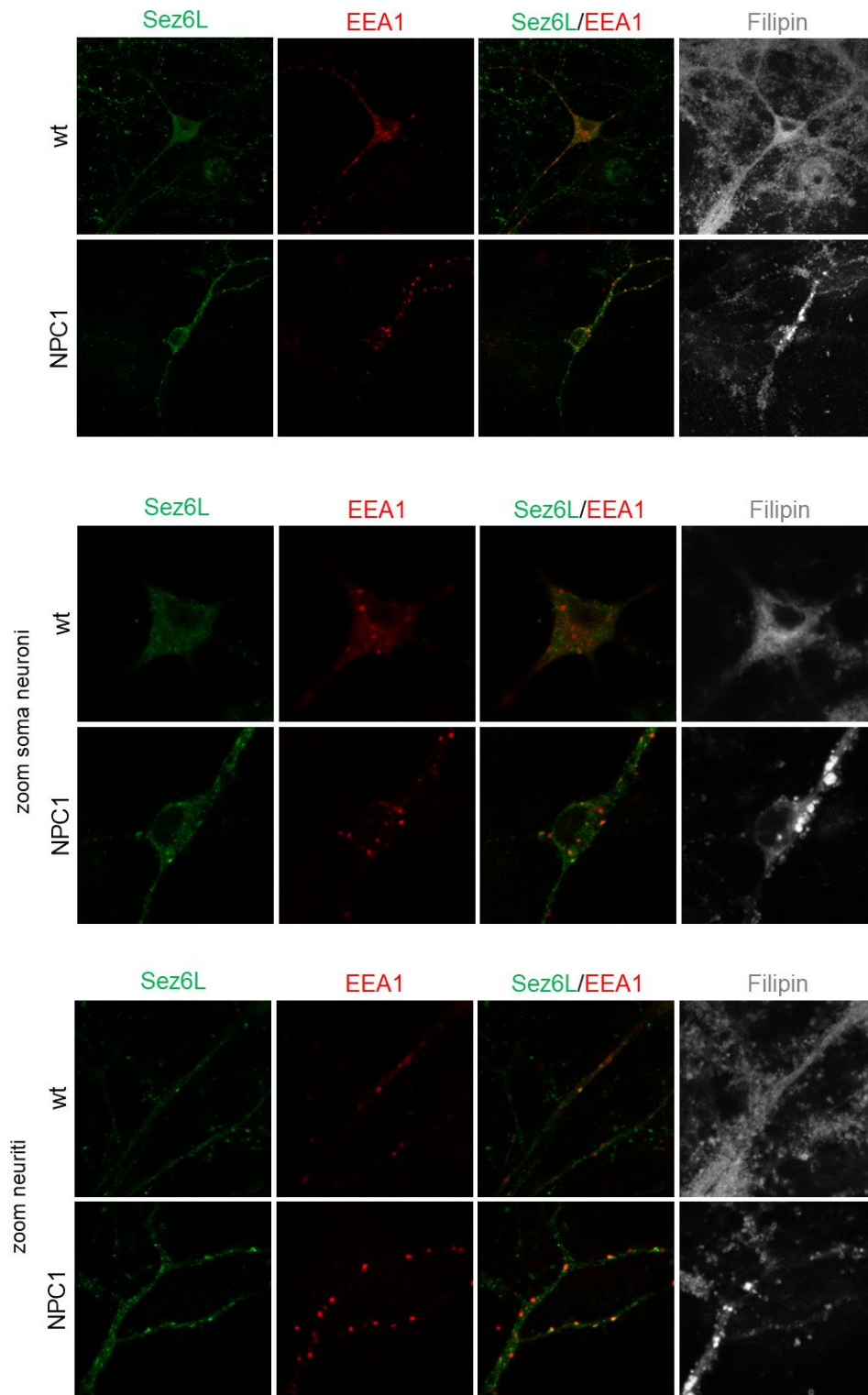
Protein Sez6 u hipokampalnim neuronima miševa NPC1 u somi i neuritima pokazuje povećanu kolokalizaciju s biljgom ranih endosoma u odnosu na neurone wt u kojima nije uočena kolokalizacija proteina Sez6 s vezikulama pozitivnim na EEA1 (Slika 11. B). Paralelno

je praćeno i nakupljanje slobodnog kolesterola bojanjem filipinom koje je pokazalo karakteristićno nakupljanje slobodnog kolesterola u somi neurona miševa NPC1 (Slika 11.).

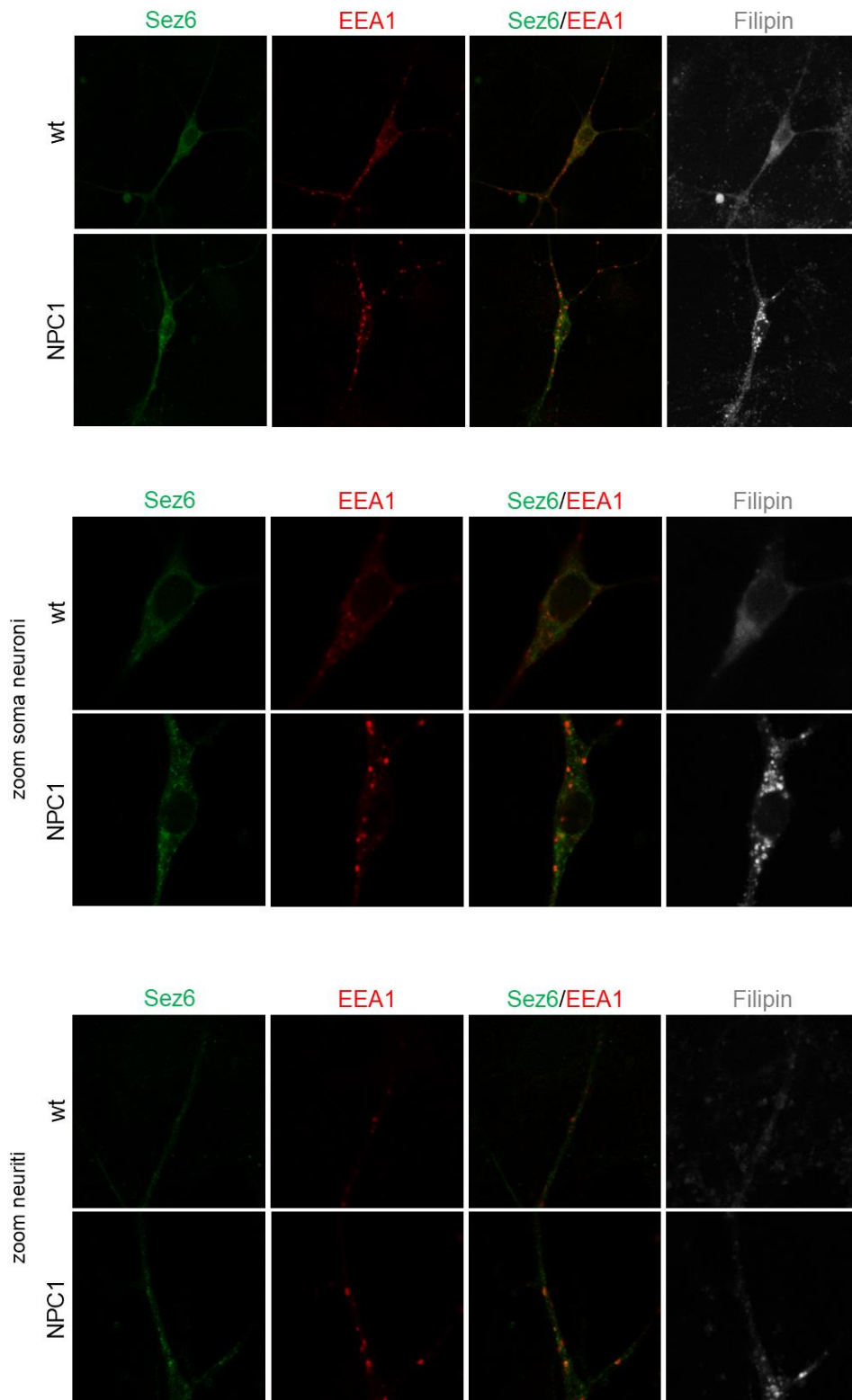
Rezultati dobiveni analizom primarnih hipokampalnih neurona miševa NPC1 u odnosu na neurone miševa wt pokazali su promijenjen smještaj supstrata BACE1- Sez6 i Sez6L te njihovu povećanu kolokalizaciju, posebice proteina Sez6L, s vezikulama pozitivnim na EEA1 u neuronima NPC1 ukazujući na njihovo nakupljanje u ranim endosomima- organelima koji imaju optimalni pH za aktivnost proteaze BACE1.



A)



**B)**



**Slika 11. Hipokampalni neuroni miševa NPC1 pokazuju povećanu kolokalizaciju proteina Sez6L i Sez6 s vezikulama pozitivnim na bijeg ranih endosoma-EEA1.** Hipokampalni neuroni izolirani su iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), te su uzgajani u kulturi 14 dana. Neuroni su fiksirani i obilježeni specifičnim antitijelima A) za protein Sez6L i biljeg ranih endosoma EEA1, B) za protein Sez6 i biljeg ranih endosoma, EEA1. Bojanje filipinom je pokazalo nakupljanje slobodnog neesterificiranog kolesterola u somi neurona NPC1 u odnosu na neurona wt. Obilježeni neuroni su gledani konfokalnim laserskim mikroskopom.

### **4.3. Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 u primarnim kulturama neurona miševa NPC1 i wt**

Kako bismo ispitali ulogu te molekularni mehanizam povećanog djelovanja proteaze BACE1 u bolesti NPC analizirali smo utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na proteolizu i smještaj njenih supstrata kao i na patološka obilježja ove bolesti. Za inhibiciju BACE1 korišten je inhibitor C3 koji se veže na aktivno mjesto proteaze i na taj način blokira njenu proteolitičku aktivnost.

Primarni kortikalni i hipokampalni neuroni izolirani iz miševa NPC1 i wt postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), uzgajani su ukupno 14 dana u kulturi. Na dvanaesti dan u kulturi su tretirani inhibitorom C3 koncentracije 2  $\mu$ M. Nakon 48 h tretmana sakupljen je stanični lizat i medij kortikalnih neurona koji su korišteni za analizu metodom Western blot, a hipokampalni neuroni su nakon tretmana fiksirani i korišteni za imunocitokemijske analize.

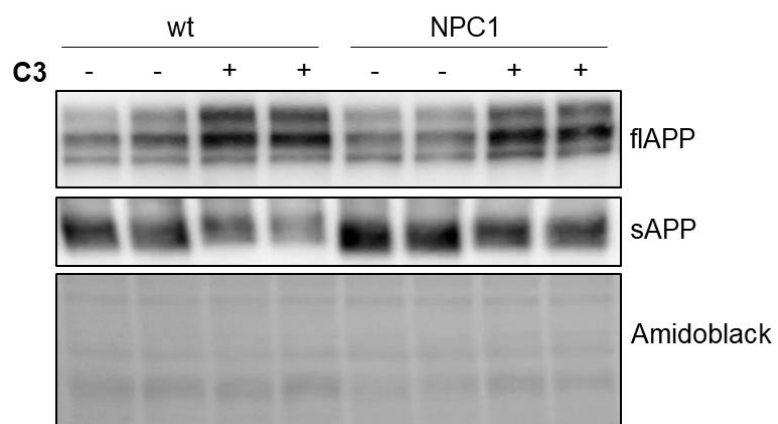
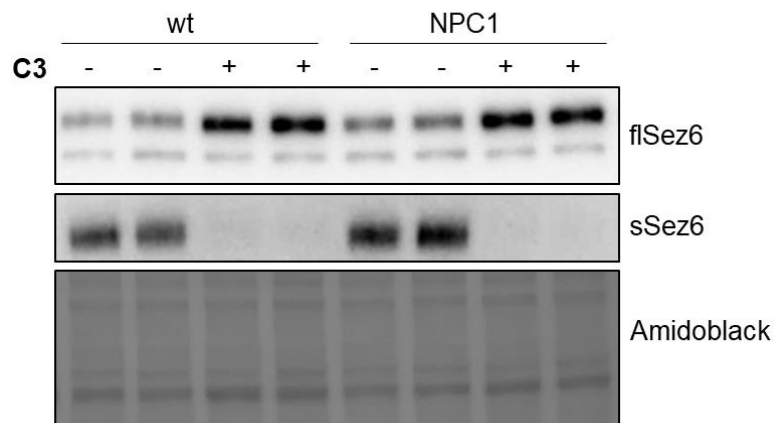
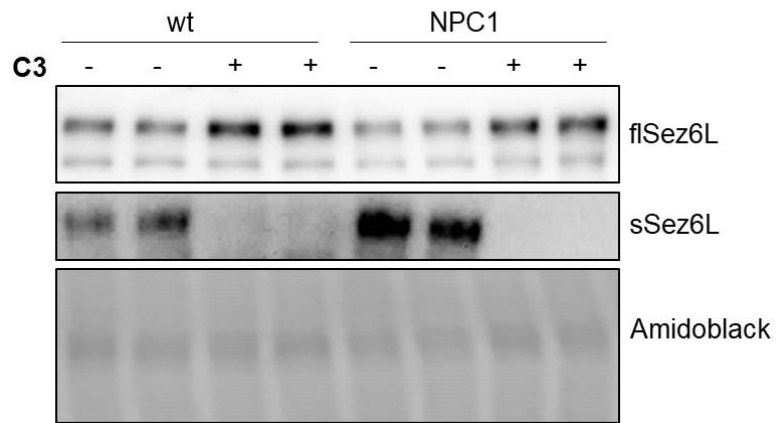
#### **4.3.1. Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na razinu supstrata enzima BACE1 u primarnim kulturama**

Kako bi ispitali učinkovitost inhibicije proteaze BACE1 analizirane su razine nepocijepanih i pocijepanih proteina Sez6L, Sez6, APP. U staničnim lizatima primarnih kortikalnih neurona tretiranih 48 h inhibitorom C3 pokazano je da dolazi do nakupljanja nepocijepanih proteina flSez6L, flSez6 i flAPP u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 i wt u odnosu na njihovu razinu u staničnim lizatima netretiranih uzoraka uslijed inhibicije njihovog cijepanja proteazom BACE1 (Slika 12. A). Razina proteina flSez6 bila je statistički značajno povećana u C3 tretiranim primarnim kortikalnim neuronima miševa wt i NPC1 u odnosu na njihove razine u netretiranim uzorcima, dok za proteine flSez6L i flAPP,

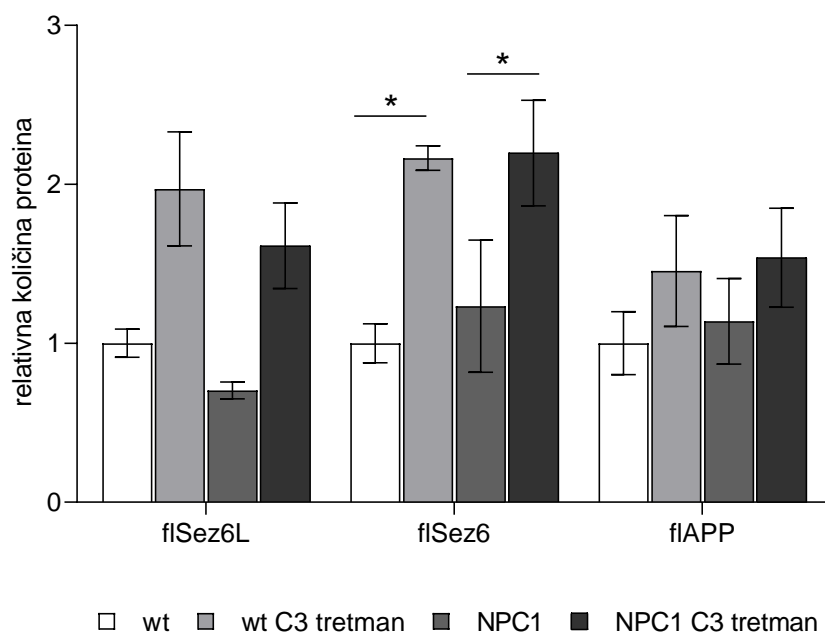
iako postoji trend nakupljanja, razlika u razini između tretiranih i netretiranih uzoraka nije pokazala statističku značajnost (Slika 12. B) .

U mediju netretiranih i inhibitorom C3 tretiranih primarnih kortikalnih neurona miševa NPC1 i wt analizirana je razina izlučenih N-terminalnih odsječaka supstrata BACE1-sSez6L, sSez6 i sAPP koji nastaju kao produkt cijepanja cijelovite forme proteina. Za razliku od medija netretiranih uzoraka, gdje su utvrđeni proteini sSez6L i sSez6, u prisustvu inhibitora C3 u mediju primarnih kortikalnih neurona miševa NPC1 i wt nije bilo moguće utvrditi izlučene odsječke proteina Sez6L i Sez6, što upućuje na uspješnu inhibiciju proteolize tj. cijepanja proteazom BACE1 (Slika 12. A). Nasuprot tome, u mediju tretiranih neurona kao i u mediju netretiranih primarnih kortikalnih neurona miševa NPC1 i wt, utvrđeni su izlučeni odsječci proteina APP, a njihova razina je bila niža u mediju tretiranih uzoraka u odnosu na netretirane ukazujući na smanjenu proteolizu proteina APP uslijed inhibicije proteaze BACE1 (Slika 12. B). Za detekciju izlučenih odsječaka proteina APP korišteno je antitijelo koje detektira ukupnu količinu N-terminalnih odsječaka APP (sAPP $\alpha$  i sAPP $\beta$ ). Naime, za razliku od proteina Sez6L i Sez6, koji su isključivi supstrati proteaze BACE1, protein APP se osim proteazom BACE1 u stanici cijepa i drugim sekretazama. Zbog toga inhibicijom enzima BACE1 nismo dobili potpuno ukidanje stvaranja sAPP odsječaka kao kod Sez6 i Se6L supstrata. Zbog nedovoljne osjetljivost antitijela i/ili niske koncentracije nije bila moguća detekcija odsječka sAPP $\beta$ , izravnog produkta cijepanja proteina APP proteazom BACE1. Ovi rezultati su pokazali da je uspostavljena uspješna inhibicija proteaze BACE1 koja se očitovala nakupljanjem nepocijepanog oblika proteina Sez6L i Sez6 i nemogućnosti detekcije pripadajućih izlučenih N-terminalnih odsječaka u mediju u kojem su neuroni uzgajani.

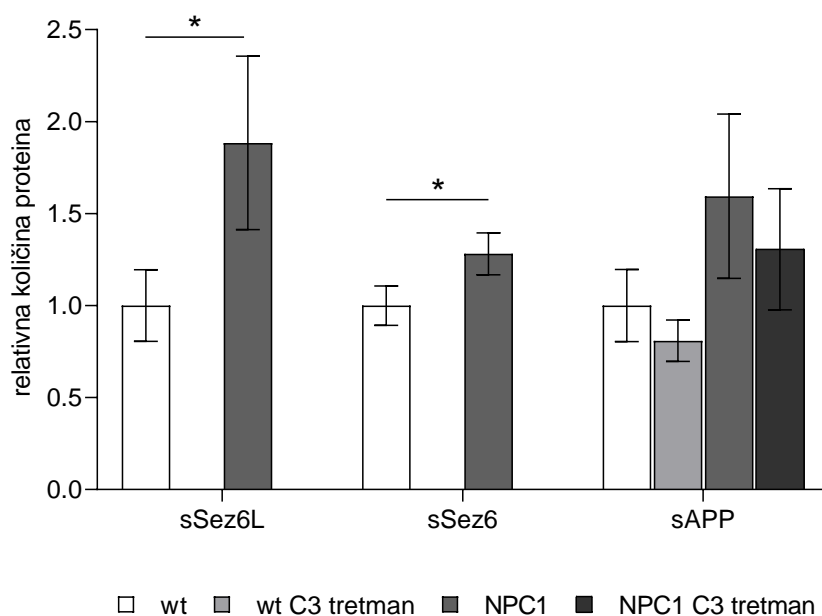
A)



B)

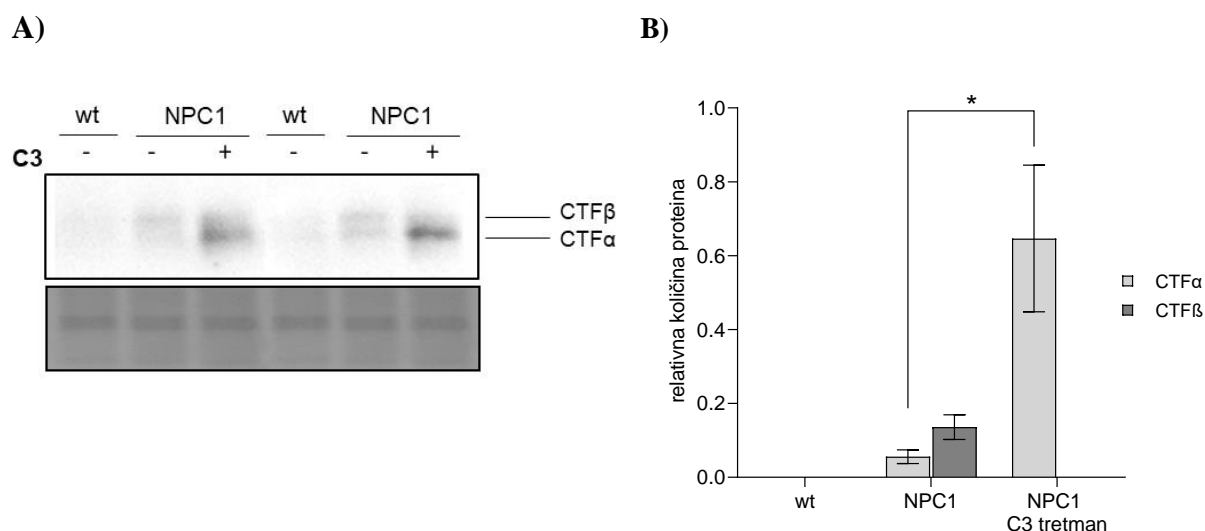


C)



**Slika 12. Inhibicija proteaze BACE1 u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 i wt blokira proteolizu supstrata Sez6L i Sez6.** Primarni kortikalni neuroni izolirani su iz mladunaca postanalnog dana 0-1 (P0-P1), te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2  $\mu$ M, 48h). A) Razina proteina Sez6L, Sez6, APP u staničnom lizatu (flSez6L, flSez6, flAPP) i mediju (sSez6L, sSez6, sAPP) analizirana je metodom Western blot. B, C) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa kvantificirani su programom Image J i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom, te su statistički obrađeni. Statistička značajnost izračunata je statističkim testom ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom: \* $p < 0,05$ . Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

Zbog nemogućnosti detekcije sAPP $\beta$  odsječaka u mediju primarnih kortikalnih neurona, analizirane su endogene razine C-terminalnih membranskih odsječaka proteina APP, CTF $\beta$  i CTF $\alpha$ , u staničnim lizatima netretiranih i inhibitorom C3 tretiranih primarnih kortikalnih neurona između miševa NPC1 i wt. Kako bismo razdvojili CTF $\beta$  i CTF $\alpha$  odsječke koji imaju malu molekulska masu (manje od 15 kDa) uzorci staničnih lizata su razdvojeni u peptidnom Tris-tricin gelu koji se koristi za radvajanje proteina manjih od 30 kDa (Schägger, 2006). U staničnim lizatima neurona miševa wt nije bilo moguće utvrditi endogene razine odsječaka CTF $\beta$  i CTF $\alpha$ , dok je u neuronima miševa NPC1 detektirana povećana količina odsječaka CTF $\beta$  - izravnog produkta cijepanja supstrata APP proteazom BACE1, uz prisutnost slabijeg signala odsječaka CTF $\alpha$  (Slika 13. A). Tretman inhibitorom BACE1 (C3) uzrokovao je značajno povećanje razine CTF $\alpha$  odsječaka u neuronima NPC1 u odnosu na netretirane neurone upućujući na uspješnu inhibiciju cijepanja supstrata APP proteazom BACE1 (amiloidogeni put razgradnje) te paralelnu aktivaciju neamiloidogenog puta razgradnje proteina APP  $\alpha$ -sekretazom (Slika 13. B). Analiza C-terminalnih odsječaka proteina APP je dodatno potvrdila uspješnu inhibiciju proteaze BACE1 u primarnim kortikalnim neuronima.



**Slika 13. Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na razinu C-terminalnih odsječaka proteina APP u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1.** Primarni kortikalni neuroni izolirani su iz mladunaca postanalnog dana 0-1 (P0-P1), uzgajani su u kulturi ukupno 14 dana. Dvanaesti dan u kulturi su tretirani inhibitorom C3 (2  $\mu$ M, 48h). A) Razina C-terminalnih odsječaka proteina APP u staničnom lizatu analizirana je metodom Western blot. B) Rezultati dobiveni metodom Western blot kvantificirani su programom Image J (NIH, SAD) i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom, te su analizirani statističkim testom ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom \*p<0,05. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

#### 4.3.2. Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na smještaj supstrata Sez6L i Sez6 u primarnim kulturama hipokampalnih neurona miševa NPC1 i wt

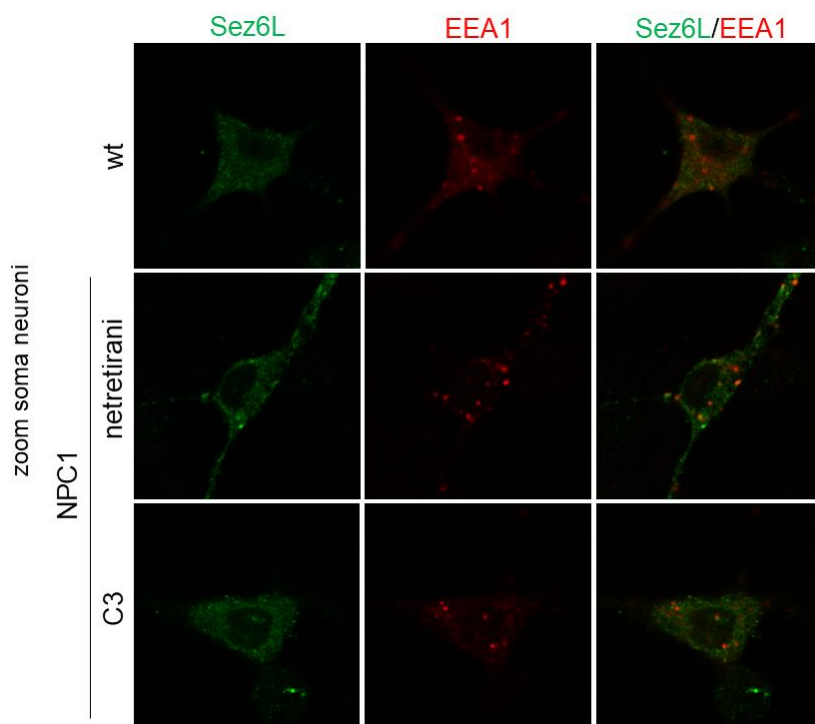
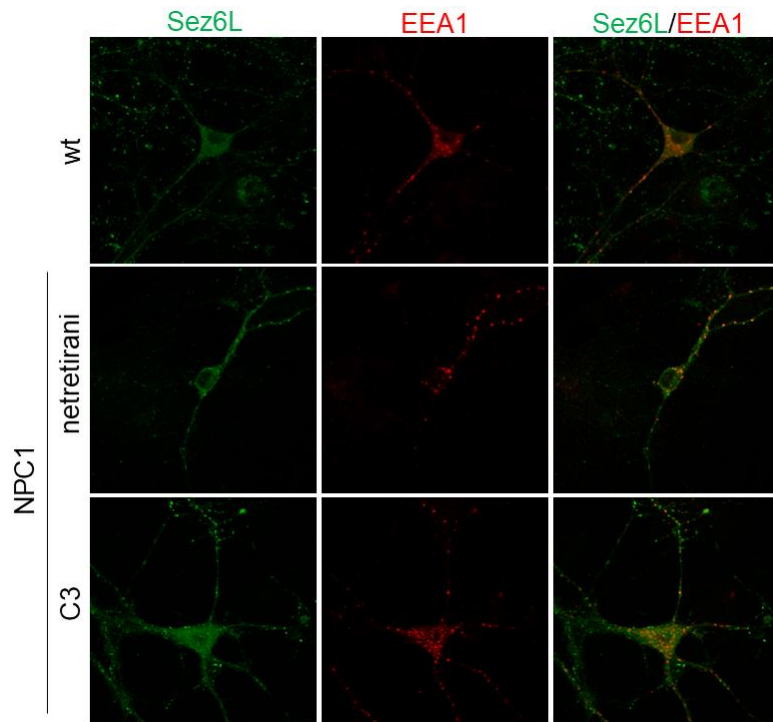
Pratili smo također kako inhibicija proteaze BACE1 utječe na smještaj supstrata BACE1- proteina Sez6L i Sez6 u primarnim hipokampalnim neuronima miševa NPC1 i wt te njihovu kolokalizaciju s biljgom ranih endosoma-EEA1, za koje smo prethodno pokazali povećano nakupljanje u ovim organelima u neuronima miševa NPC1.

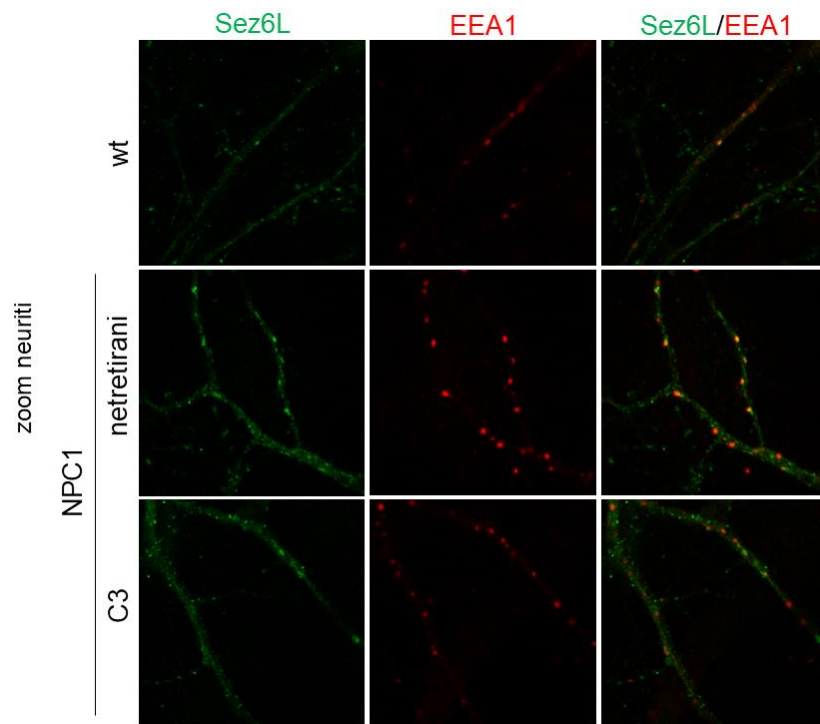
Imunocitokemijskom analizom proteina Sez6L u neuronima miševa NPC1 tretiranim inhibitorom proteaze BACE1- C3, u somi neurona je uočen je difuzniji signal, bez definiranih nakupina, slično bojanju Sez6L u neuronima miševa wt. Osim toga, u neuritima tretiranih neurona miševa NPC1 uočen je manji broj nakupina u usporedbi s netretiranim neuronima NPC1. Analiza kolokalizacije proteina Sez6L s biljgom ranih endosoma-EEA1 u tretiranim neuronima miševa NPC1 pokazala je da uslijed inhibicije proteaze BACE1 dolazi do smanjene kolokalizacije Sez6L i EEA1 pozitivnih vezikula u odnosu na prethodno uočenu povećanu kolokalizaciju u netretiranim neuronima NPC1. (Slika 14. A).

Nakon tretmana inhibitorom C3 u somi neurona NPC1 signal za protein Sez6 je bio difuzan bez uočenih nakupina, sličan signalu u neuronima wt. Također, u neuritima tretiranih neurona NPC1 uočen je smanjen signal i smanjenje nakupina u usporedbi s netretiranim neuronima miševa NPC1. U tretiranim neuronima miševa NPC1 analiza kolokalizacije proteina Sez6 s biljgom ranih endosoma-EEA1 pokazala je smanjenu kolokalizaciju proteina Sez6 i EEA1 u neuritima u usporedbi s netretiranim neuronima miševa NPC1, dok u somi nije utvrđena kolokalizacija u netretiranim kao ni u tretiranim neuronima (Slika 14. B). Sumarno, ovi rezultati su pokazali da inhibicija proteaze BACE1 „popravlja“ poremećeni smještaj te nakupljanje supstrata-Sez6L i Sez6 i vezikula EEA1 u neuritima neurona NPC1. Dobiveni nalaz ukazuje da bi povećano cijepanje supstrata proteazom BACE1 moglo doprinjeti patološkim karakteristikama bolesti NPC, posebice disfunkciji endolizosomalnog puta.

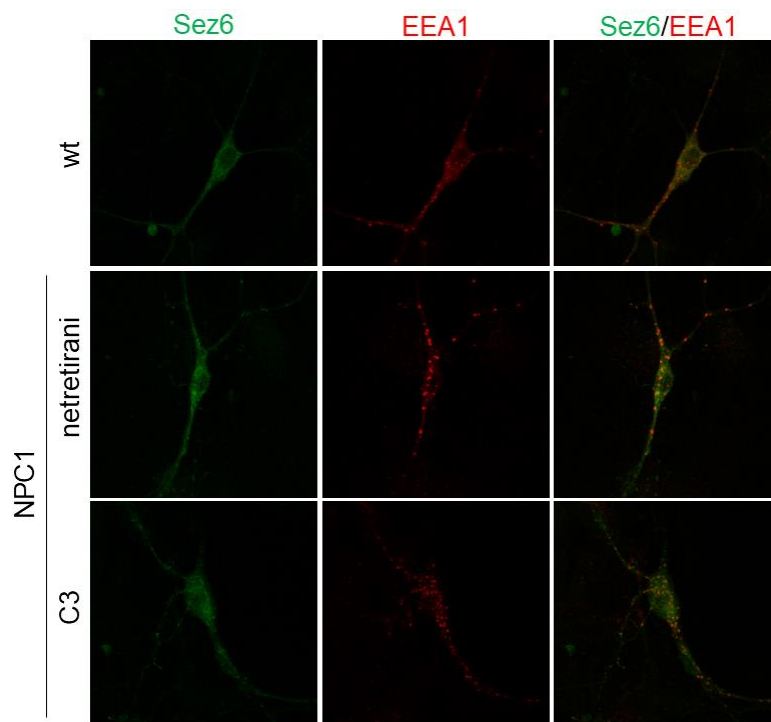


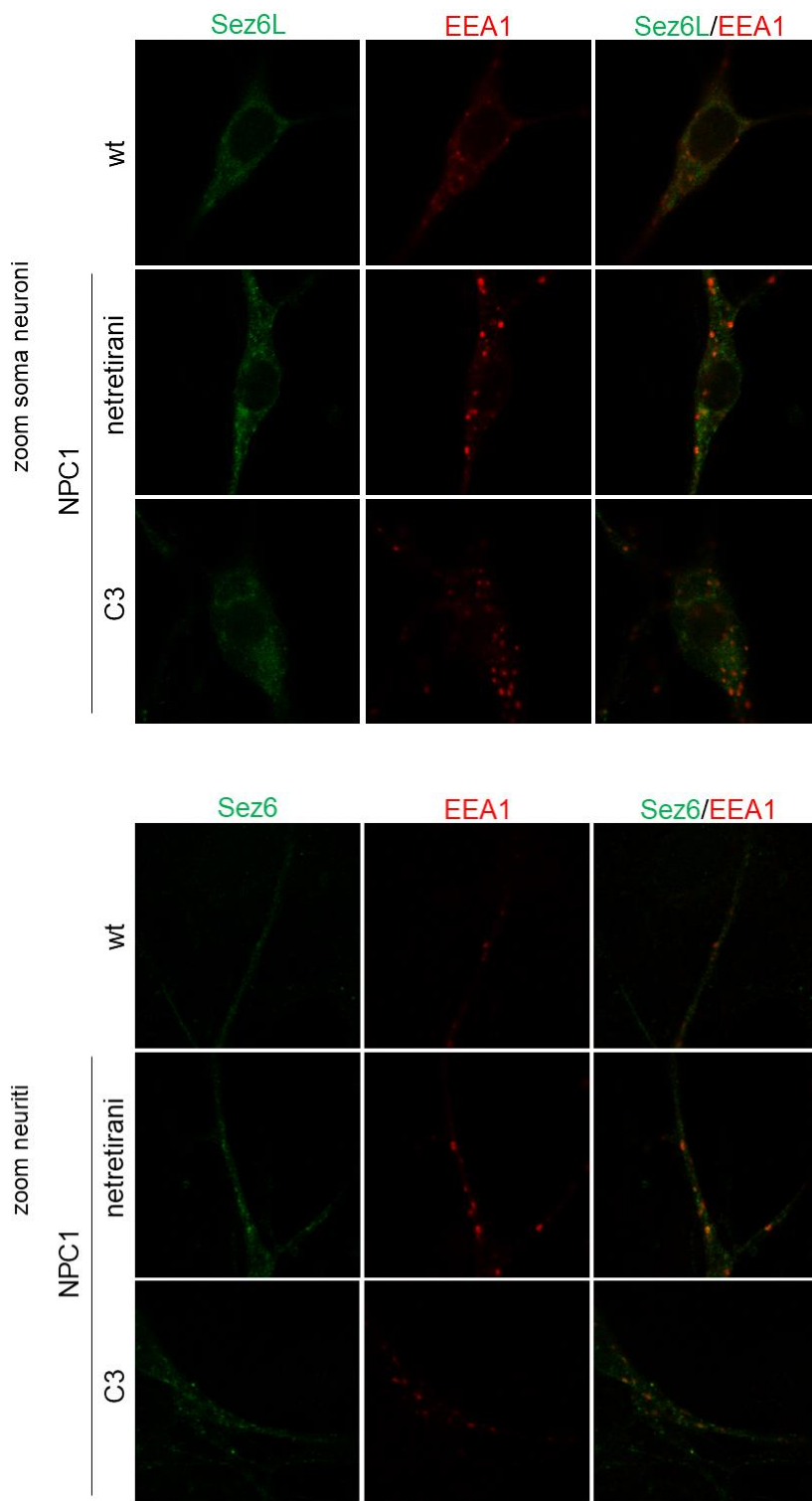
A)





**B)**



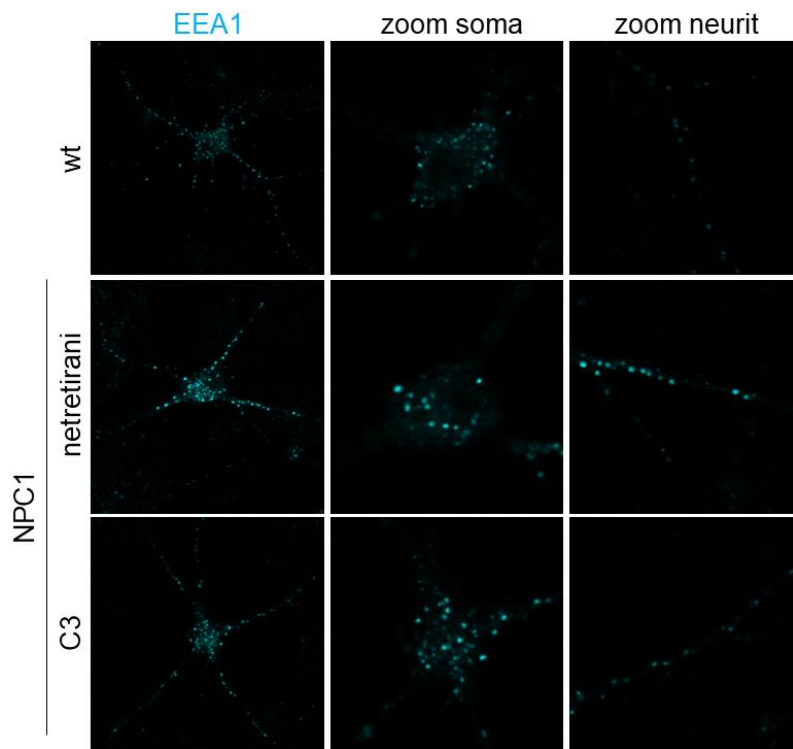


**Slika 14. Tretman inhibitorom proteaze BACE1 smanjuje kolokalizaciju proteina Sez6L i Sez6 s vezikulama pozitivnim na bijeg ranih endosoma-EEA1.** Hipokampalni neuroni izolirani su iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1) te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2 $\mu$ M). Nakon 48h hipokampalni neuroni su fiksirani i obilježeni specifičnim antitijelima A) za protein Sez6L i biljeg ranih endosoma EEA1, B) za protein Sez6 i biljeg ranih endosoma, EEA1. Obilježeni neuroni su gledani konfokalnim laserskim mikroskopom.

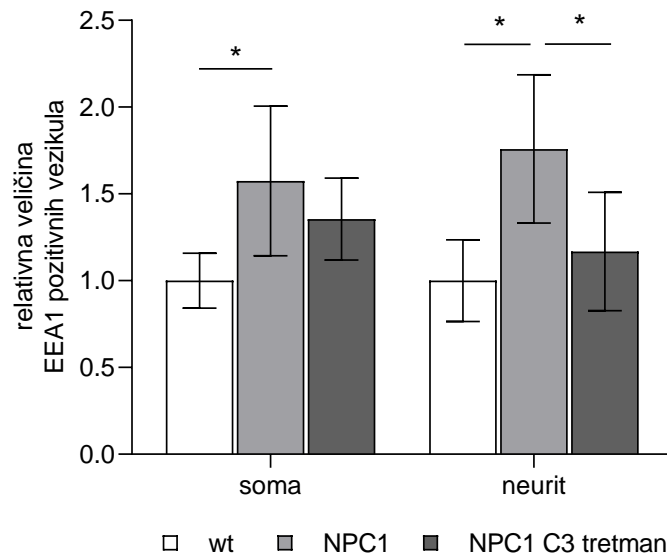
#### 4.3.3. Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na smještaj i razinu proteina endolizosomalnog puta u primarnim kulturama neurona miševa NPC1 i wt

Budući da je disfunkcija endolizosomalnog puta jedna od patoloških obilježja bolesti NPC ispitan je utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na smještaj i razinu proteina endolizosomalnog puta u primarnim kulturama miševa NPC1 i wt. Imunocitokemijska analiza i kvantifikacija dobivenog signala biljega ranih endosoma (EEA1) u primarnim hipokampalnim neuronima pokazala je pojačani signal za protein EEA1 u somi i neuritima neurona miševa NPC1 u odnosu na wt (Slika 15. A i B). U neuronima miševa wt uočeno je više manjih raspršenih EEA1 pozitivnih vezikula po čitavoj stanici dok su u neuronima miševa NPC1 (u somi i u neuritima) uočene značajno jače, izraženije i veće EEA1 pozitivne vezikule u odnosu na wt (Slika 15. A i B). Također, u neuronima miševa NPC1, posebice u neuritima je utvrđen značajno povećan broj velikih EEA1 pozitivnih vezikula ( $\geq 0.5 \mu\text{m}^2$ ) u odnosu na wt neurone (Slika 15. C). Inhibicija proteaze BACE1 u neuronima miševa NPC1 dovodi do smanjenja veličine vezikula pozitivnih na EEA1, posebice u neuritima neurona gdje dolazi do značajnog smanjenja broja velikih EEA1 pozitivnih vezikula ( $\geq 0.5 \mu\text{m}^2$ ) u odnosu na netretirane neurone NPC1 (Slika 15. B i C). Ovi rezultati pokazali su da postoji razlika u morfolologiji i smještaju vezikula ranih endosoma između neurona miševa NPC1 i wt, te da inhibicija proteaze BACE1 u neuronima miševa NPC1 djelomično „popravlja“ nakupljanje i poremećen transport vezikula ranih endosoma, tj. EEA1 pozitivnih vezikula.

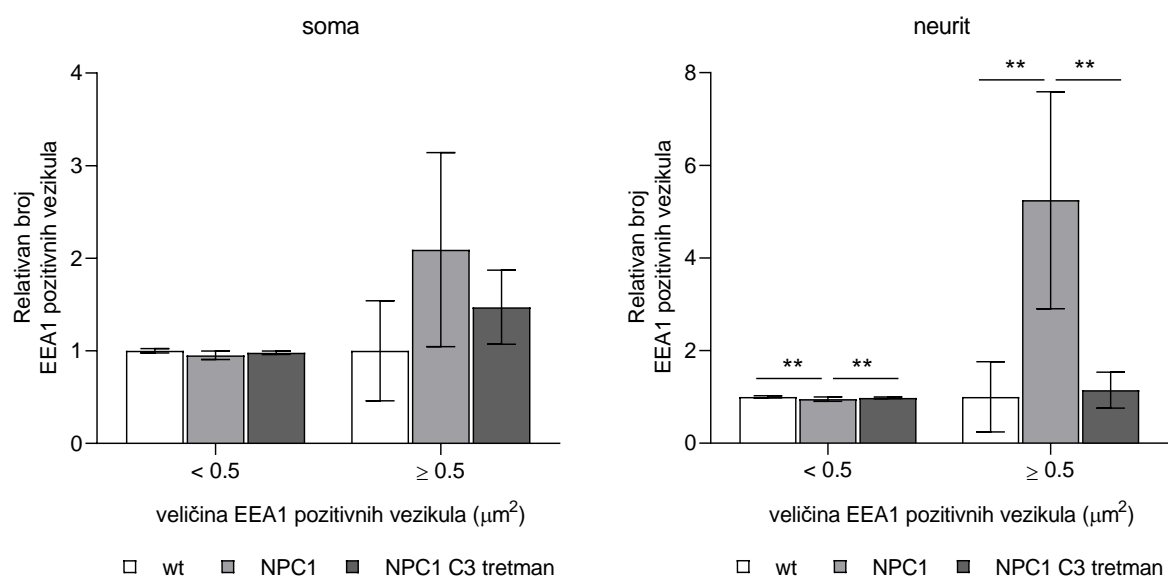
A)



B)

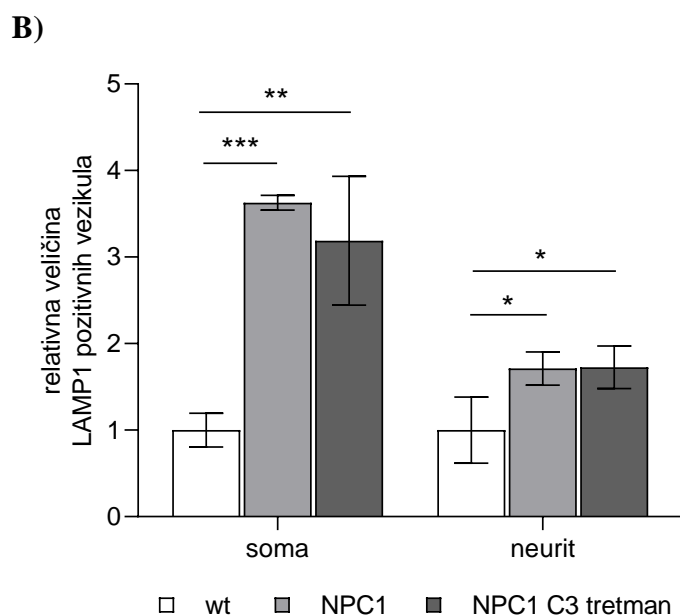
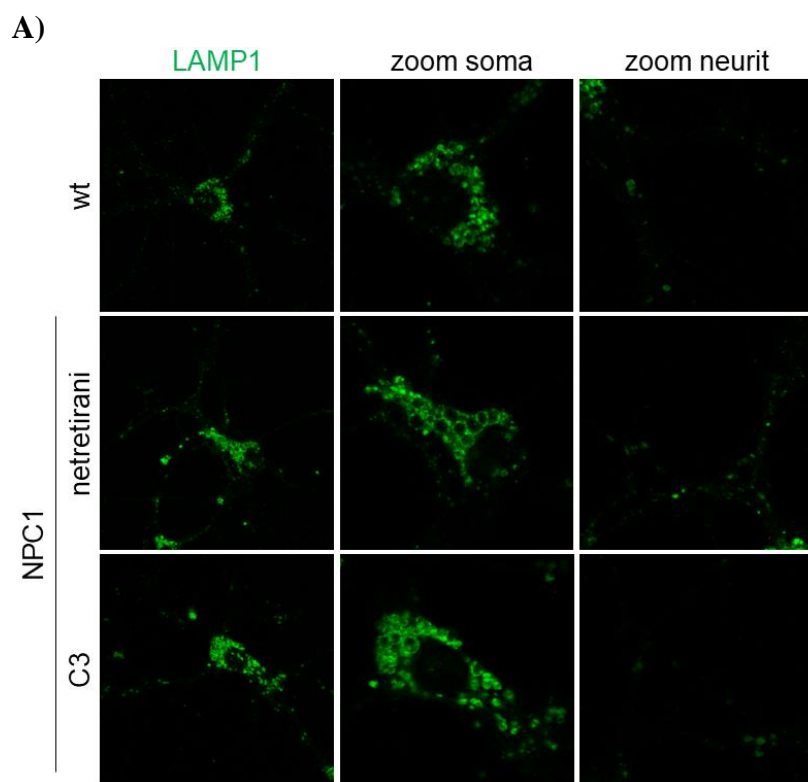


C)



**Slika 15. Tretman inhibitorom proteaze BACE1 utječe na smještaj i morfologiju ranih endosoma u primarnim hipokampalnim neuronima miševa NPC1.** Hipokampalni neuroni izolirani su iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 ( $2\mu\text{M}$ ). Nakon 48h hipokampalni neuroni su fiksirani i A) obilježeni specifičnim antitijelom za biljeg ranih endosoma EEA1. Obilježeni neuroni su gledani konfokalnim laserskim mikroskopom. B) Veličina EEA1 pozitivnih vezikula u somi i neuritima netretiranih i inhibitorom BACE1 tretiranih hipokampalnih neurona wt i NPC1 kvantificirana je u programu Image J. C) Broj EEA1 pozitivnih vezikula manjih od  $0.5 \mu\text{m}^2$  i većih ili jednakih  $0.5 \mu\text{m}^2$  u somi i neuritima netretiranih i inhibitorom BACE1 tretiranih hipokampalnih neurona wt i NPC1 kvantificiran je u programu Image J. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD,  $n=30$  stanica po grupi iz 3 nezavisna pokusa. Statistička značajnost izračunata je statističkim testom ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom: \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ .

Analiza biljega lizosoma-LAMP1 pokazala je prisutnost značajno povećanih lizosoma u somi hipokampalnih neurona miševa NPC1 u odnosu na wt. U neuronima NPC1 tretiranim inhibitorom proteaze BACE1 nije uočena promjena u morfologiji niti smještaju vezikula pozitivnih na LAMP1 u odnosu na netretirane neurone miševa NPC1 (Slika 16. A i B).

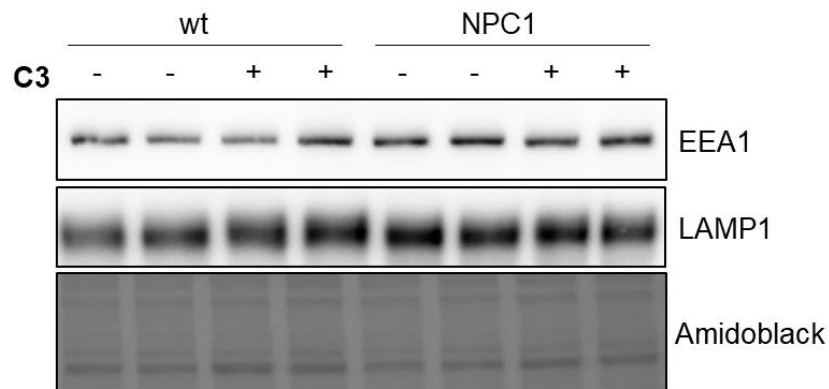


**Slika 16. Tretman inhibitorom proteaze BACE1 ne utječe na smještaj i morfologiju lizosoma u primarnim hipokampalnim neuronima miševa NPC1.** Hipokampalni neuroni izolirani su iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2 $\mu$ M). Nakon 48h hipokampalni neuroni su fiksirani i A) obilježeni specifičnim antitijelom za biljeg lizosoma LAMP1. Obilježeni neuroni su gledani konfokalnim laserskim mikroskopom. B) Veličina LAMP1 pozitivnih vezikula u somi i neuritima netretiranih i inhibitorom BACE1 tretiranih hipokampalnih neurona wt i NPC1 kvantificirana je u programu Image J. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD, n= 30 stanica po grupi iz 3 nezavisna pokusa.

Statistička značajnost izračunata je statističkim testom ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

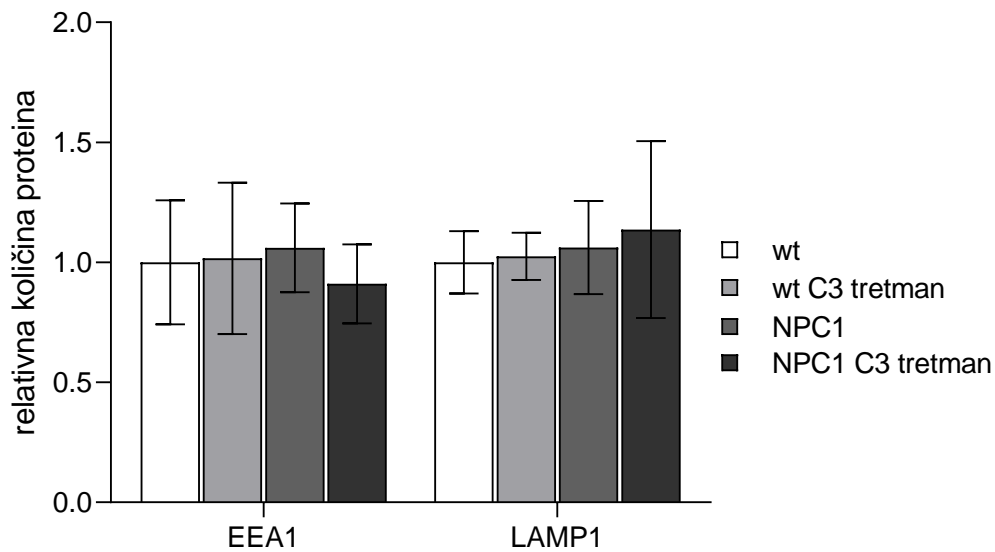
Nadalje, s obzirom na uočenu promijenjenu morfologiju ispitanih biljega staničnih organela endoslizosomalnog puta analizirane su proteinske razine biljega EEA1 i LAMP1 u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 i wt. Iako je imunocitokemijska analiza pokazala razlike u morofologiji vezikula pozitivnih na biljege EEA1 i LAMP1 između neurona miševa NPC1 i wt, analiza metodom Western blot nije pokazala značajne promjene u proteinskoj razini ovih biljega između neurona miševa NPC1 i wt. Također, nakon tretmana inhibitorom BACE1 nisu uočene značajne promjene u proteinskoj razini biljega EEA1 i LAMP1 u odnosu na netretirane neurone miševa NPC1 i wt (Slika 17.). Ovi rezultati pokazali su da disfunkcija endolizosomalnog puta te uočena promijenjena morfologija organela u mišjim neuronima NPC1 u odnosu na wt nije popraćena promijenjenom razinom proteina EEA1 i LAMP1 te da inhibicija proteaze BACE1 ne utječe na razinu proteina EEA1 i LAMP1.

A)





**B)**



**Slika 17. Inhibicija proteaze BACE1 ne utječe na razine proteina endolizosomalnog puta u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 i wt.** Primarni kortikalni neuroni su izolirani iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2 $\mu$ M, 48h). A) Pripremljeni stanični lizati analizirani su metodom Western blot na proteine endolizosomalnog puta- EEA1 (biljeg ranih endosoma) i LAMP1 (biljeg lizosoma). B) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa kvantificirani su programom Image J i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom te analizirani statističkim testom ANOVA. Nije zabilježena statistička značajnost. Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

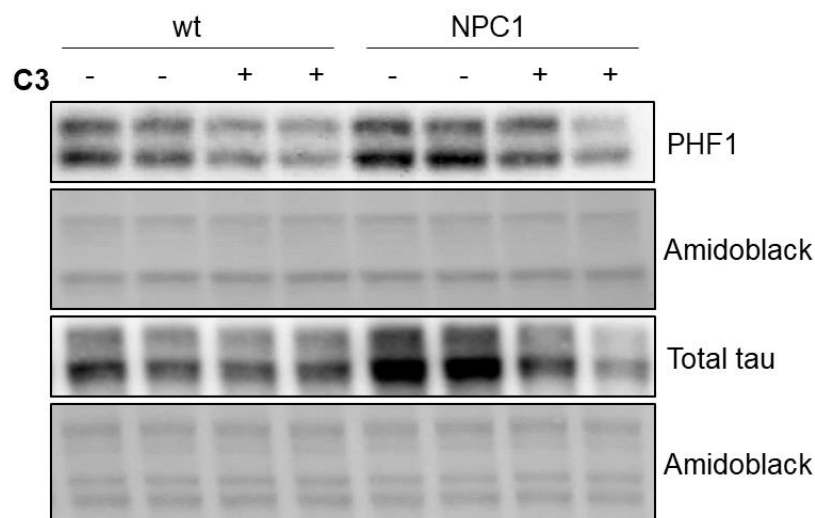
#### 4.3.4. Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na razinu i smještaj hiperfosforiliranog i ukupnog proteina tau u primarnim kulturama neurona miševa NPC1 i wt

Hiperfosforilacija proteina tau te povećana razina ukupnog proteina tau jedna je od patoloških obilježja bolesti NPC1 stoga je ispitan utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na razinu i smještaj hiperfosforiliranog oblika proteina tau (PHF1) i ukupnog proteina tau (total tau) u primarnim kulturama neurona miševa NPC1 i wt.

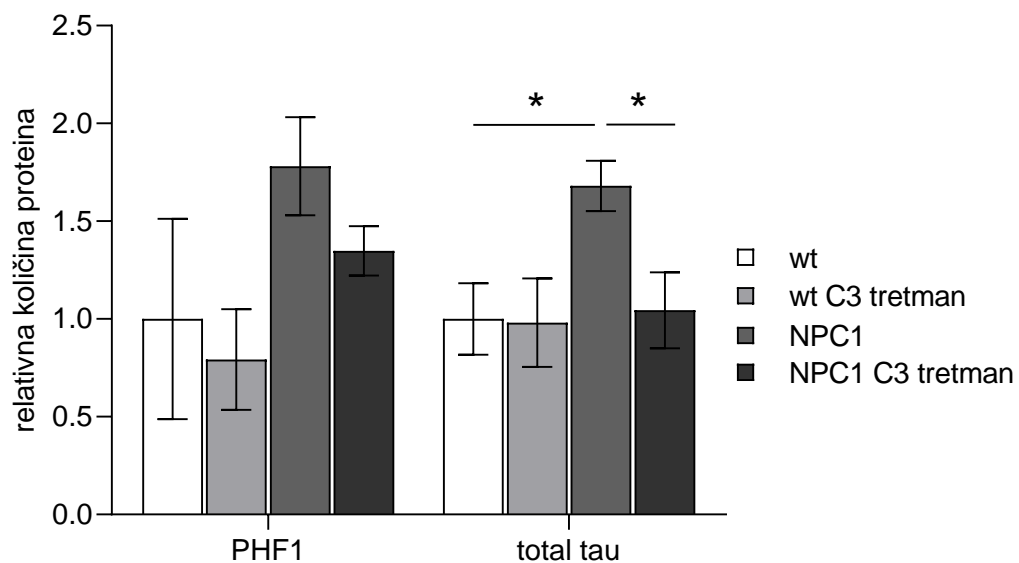
Analiza metodom Western blot u primarnim kortikalnim neuronima pokazala je da su razine hiperfosforiliranog proteina tau (PHF1), kao i ukupnog proteina tau (total tau) povišene u neuronima miševa NPC1 u odnosu na wt (Slika 18. A). Dok je povišena razina ukupne količine proteina tau u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 u usporedbi s wt statistički značajna, razina proteina PHF1, iako je povišena u neuronima miševa NPC1 u odnosu

na wt, nije pokazala statističku značajnost. Inhibicija proteaze BACE1 rezultirala je smanjenom razinom proteina PHF1 u neuronima miševa NPC1 i wt u odnosu na netretirane uzorke. Dok je tretman inhibitorom C3 u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 značajno smanjio razinu ukupnog proteina tau u odnosu na netretirane uzorke, u neuronima miševa wt nije uočena razlika u razini ukupnog proteina tau između tretiranih i netretiranih uzoraka (Slika 18. B). Dobiveni rezultati su pokazali da neuroni NPC1 pokazuju karakterističnu povećanu razinu ukupnog proteina tau kao i hiperfosforiliranog oblika tau te da inhibicija proteaze BACE1 dovodi do smanjenje razine oba oblika tau proteina.

A)

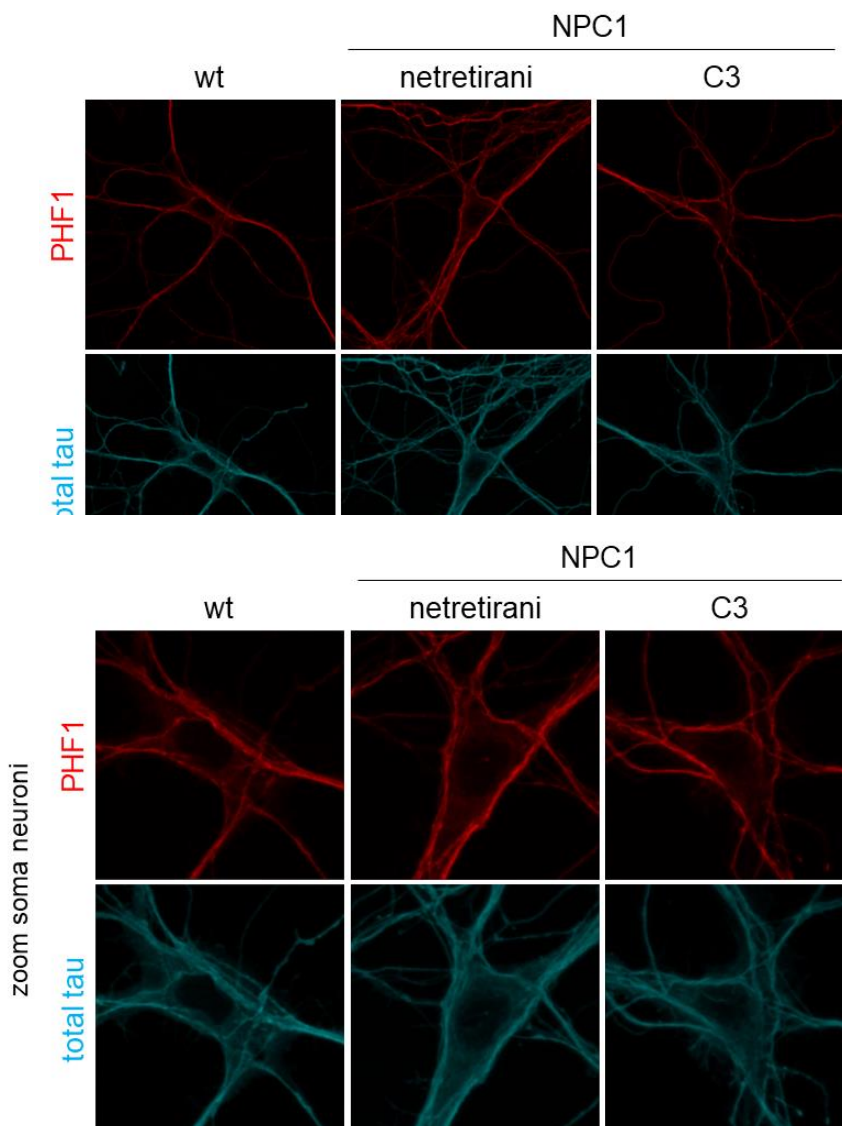


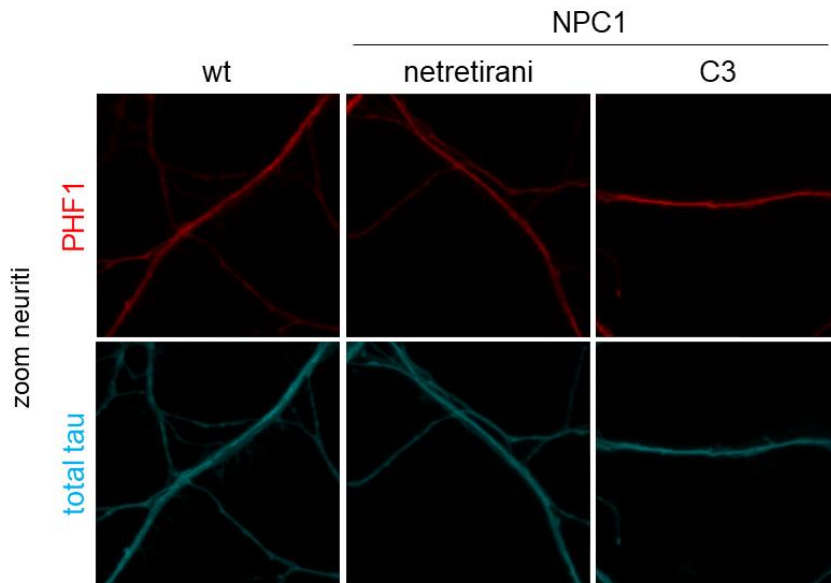
B)



**Slika 18. Razina ukupnog proteina tau je značajno smanjene u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 tretiranim inhibitorom proteaze BACE1.** Primarni kortikalni neuroni su izolirani iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2 $\mu$ M, 48h). A) Pripremljeni stanični lizati analizirani su metodom Western blot: hiperfosforilirani protein tau (PHF1) i ukupni protein tau (total tau). B) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa kvantificirani su programom Image J i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom. Statistička značajnost izračunata je statističkim testom ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom: \* $p < 0,05$ . Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

Imunocitokemijska analiza nije pokazala razliku u dobivenom signalu za proteine PHF1 i total tau između primarnih hipokampalnih neurona miševa NPC1 i wt. Također, tretman inhibitorom C3 nije uzrokovao promjene signala za proteine PHF1 i total tau između netretiranih i tretiranih neurona miševa NPC1 i wt (Slika 19.).





**Slika 19. Imunocitokemijska analiza hiperfosforiliranog i ukupnog proteina tau u primarnim hipokampalnim neuronima miševa NPC1 i wt tretiranim inhibitorom proteaze BACE1.** Imunocitokemijska analiza nije pokazala razlike u bojanju hiperfosforiliranog (PHF1) i ukupnog proteina tau (total tau) između neurona NPC1 i wt, kao ni razlike između netretiranih neurona i neurona tretiranih inhibitorom proteaze BACE1-C3 u miševima NPC1 i wt. Hipokampalni neuroni su izolirani iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1) te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2 $\mu$ M). Nakon 48h hipokampalni neuroni su fiksirani i obilježeni specifičnim antitijelima za proteine PHF1 i total tau. Obilježeni neuroni su gledani konfokalnim laserskim mikroskopom.

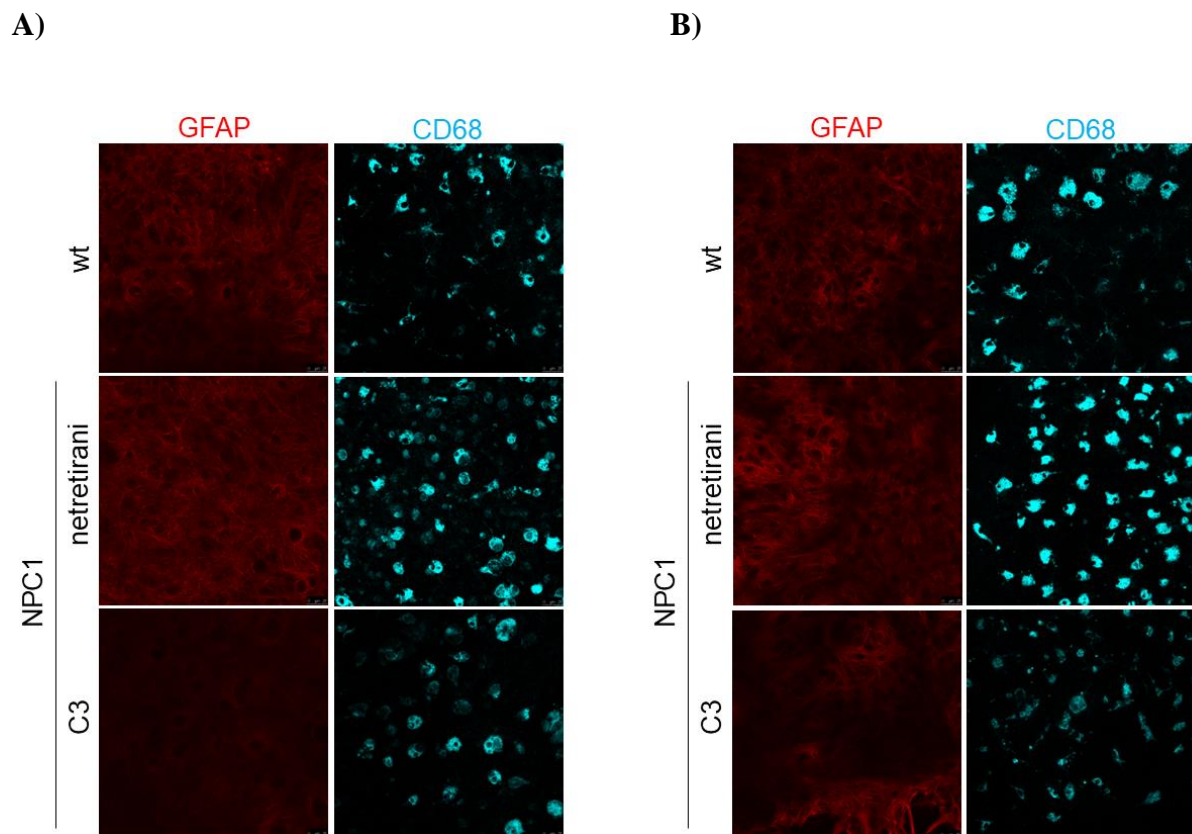
#### 4.4. Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na ključne patološke karakteristike bolesti NPC u kulturi mišjih organotipskih rezova mozga

Kako bismo dodatno razjasnili potencijalnu ulogu proteaze BACE1 u bolesti NPC ispitali smo utjecaj inhibicije enzima BACE1 u *ex vivo* modelu bolesti NPC- u kulturi organotipskih rezova mozga. Kultura organotipskih rezova mozga predstavlja fiziološki trodimenzionalni model mozga, most između primarnih kultura stanica i animanih modela, koji vjerno oponaša kompleksnost moždanog tkiva i interakciju različitih stanica u mozgu (Croft i sur., 2019). Stoga nam ovaj *ex vivo* model može dati uvid na učinak inhibicije proteaze BACE1 na patološke karakteristike bolesti NPC koje smo ispitali u primarnoj kulturi neurona (u odjeljku 4.3) kao i na neuroinflamaciju, tj. aktivaciju astrocita i mikroglija što je jedan je od primarnih, ranih događaja u patogenezi bolesti NPC.

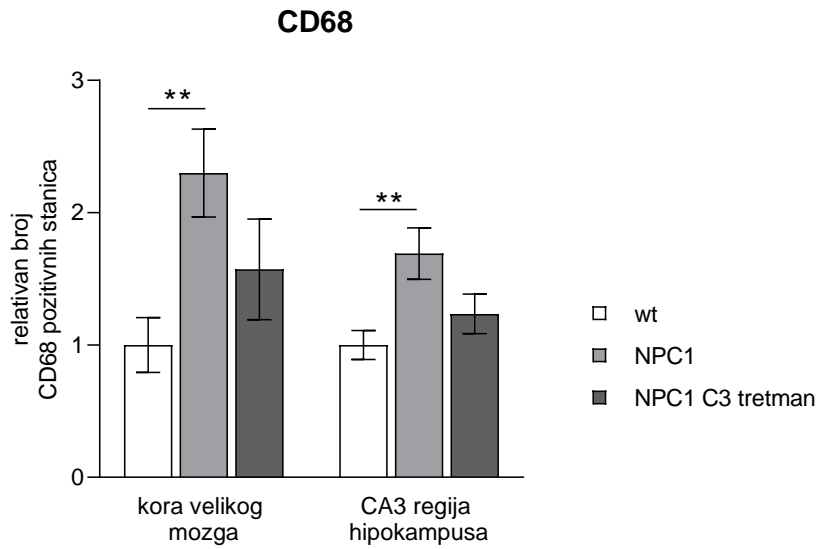
Za uspostavu organotipske kulture korištene su moždane regije velikog mozga i hipokampusa miševa wt i NPC1, starih 7 dana (P7). Nakon 21. dana u kulturi kortiko-hipokampalni rezovi miševa NPC1 i wt tretirani su inhibitorom C3 koncentracije 2  $\mu$ M ukupno 96 h (dva puta po 48 h) nakon čega su rezovi fiksirani i korišteni za imunohistokemijske analize. Nažalost zbog premalog prinosa materijala i/ili nedovoljne osjetljivosti antitijela nije bilo moguće analizirati razine proteina endolizosomalnog sustava (EEA1 i LAMP1) te razine proteina tau i hiperfosforiliranog proteina tau metodom Western blot. Stoga smo se usredotočili na analizu učinka inhibicije proteaze BACE1 u kulturi kortiko-hipokampalnih rezova miševa NPC1 i wt metodom imunohistokemije.

Metodom imunohistokemije praćena je neuroinflamacija, tj. biljezi astrocita (GFAP) i mikroglija (CD68) u netretiranim i C3 (2  $\mu$ M, 96h) tretiranim kortiko-hipokampalnim rezovima miševa NPC1 i wt. U netretiranim kortiko-hipokampalnim rezovima miševa NPC1 uočen je značajno povećan broj aktivnih mikroglija (biljeg CD68) u odnosu na wt uzorak, ukazujući da uspostavljena kultura kortiko-hipokampalnih rezova rekapitulira neuroinflamaciju koja je prisutna u mozgovima miševa NPC1 (Slika 20. A-C). Međutim, bojanje biljegom astrocita-GFAP nije pokazalo jasnu razliku između kultura kortiko-hipokampalnih rezova miševa NPC1 i wt, kao što je to pokazao biljeg mikroglija CD68. Naime, bojanje kulture organotipskih rezova biljegom GFAP je dalo difuzan signal koji je nešto jači u kulturi moždanih rezova NPC1 u odnosu na rezove wt miševa (Slika 20. A i B).

Inhibicija proteaze BACE1 u kortiko-hipokampalnim rezovima miševa NPC1 uzrokovala je sniženje signala te manji broj stanica pozitivnih na biljega aktiviranih mikroglija - CD68 u odnosu na netretirane uzorke što ukazuje na nižu aktivaciju mikroglija uslijed inhibicije proteaze BACE1 (Slika 20. A-C). Također, nakon tretmana BACE1 inhibitorom C3 u kortiko-hipokampalnim rezovima miševa NPC1 uočen je smanjeni signal biljega astrocita-GFAP u odnosu na netretirane uzorke (Slika 20. A i B). I u jednom i u drugom slučaju, razine bojanja tretiranih NPC1-rezova su bile slične signalu ovih biljega u netretiranim wt rezovima. Zbog difuznog signala bojenje GFAP-om nismo mogli kvantificirati. Stoga smo na Slici 20. C prikazali kvantitativnu analizu dobivenog signala biljega aktiviranih mikroglija - CD68.



C)

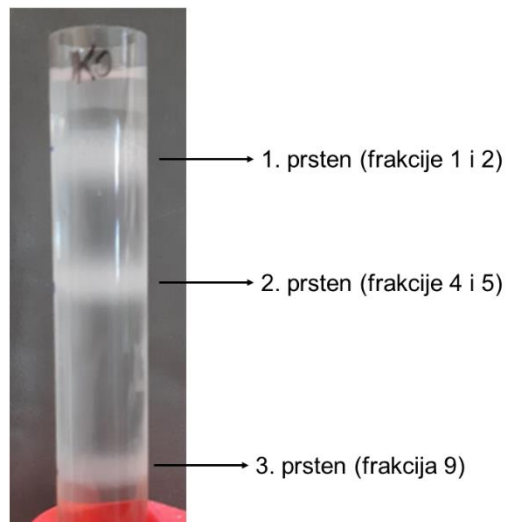


**Slika 20. Tretman inhibitorom proteaze BACE1 uzrokuje sniženje neuroinflamacije u kortiko-hipokampalnim rezovima mozgovia miševa NPC1.** Kortiko-hipokampalni rezovi su uzgajani u kulturi 21 dan nakon čega su tretirani inhibitorom proteaze BACE 1-C3 (2 $\mu$ M). Nakon 96 h rezovi mozgovia su fiksirani i obilježeni specifičnim antitijelima za biljeg astrocita- GFAP i biljeg aktiviranih mikroglia- CD68 i gledani konfokalnim laserskim mikroskopom. Prikazane su moždane regije A) kora velikog mozga i B) CA3 regija hipokampusa. C) Rezultati dobiveni imunohistokemijskom analizom CD68 pozitivnih stanica kvantificirani su u programu Image J. Statistička značajnost izračunata je statističkim testom ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

#### 4.5. Analiza endolizosomskih frakcija izdvojenih iz moždanih regija 4 tjedna starih miševa wt i NPC1

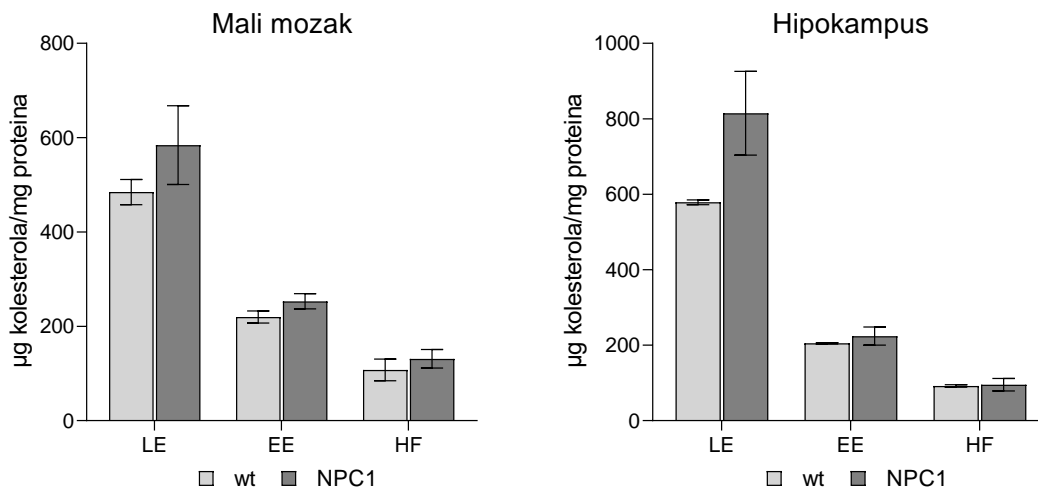
S obzirom na prethodno uočenu povećanu proteolizu supstrata BACE1 i njihovu povećanu kolokalizaciju s biljekom ranih endosoma u primarnim kulturama neurona miševa NPC1, željeli smo potvrditi ove rezultate u tkivu mišjih mozgova. Stoga je provedeno fraktioniranje vezikula endolizosoma ultracentrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu saharoze. Pri tom su analizirane dvije regije mozga: mali mozak, koji je primarno pogođen u bolesti NPC i u kojem dolazi do specifičnog i ranog odumiranja Purkinjeovih neurona, te hipokampus koji se smatra najmanje pogođen, tj. zaštićen u bolesti NPC. Korišteni su 4 tjedna stari miševi wt i NPC1, kako bismo detektirali najranije promjene, tj. one prije pojave prvih simptoma bolesti. Iz homogenata izdvojenih moždanih regija miševa wt i NPC1 dobiven je postnuklearni supernatant (PNS, engl. *postnuclear supernatant*) koji je zatim razdvojen ultracentrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze (opisano u poglavlju 3.5.2.). Nakon centrifugiranja u epruvetici su bila vidljiva tri karakteristična prstena, po jedan na svakoj granici između različitih postotaka otopine saharoze (Slika 20.). Prvi prsten (granica 8% i 25% saharoze) predstavlja najlakšu frakciju u kojoj se nalaze kasni endosomi i lizosomi, drugi prsten predstavlja frakciju ranih endosoma (granica 25% i 35% saharoze), a treći prsten (granica 35% i 40,6% saharoze) tzv. tešku frakciju u kojoj se nalaze ostatci membrana, endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata. Dvanaest frakcija (volumena 1 ml) je prikupljeno s vrha gradijenta i analizirano metodom Western blot korištenjem specifičnih antitijela za biljege endolizosomalnog puta: lizosome (LAMP1), kasne endosome (Rab7), rane endosome (EEA1) te enzim BACE1 i njegove supstrate- Sez6L, Sez6 i APP. Frakcije su označene brojevima od 1-12 pri čemu frakcija 1 predstavlja najlakšu frakciju, a 12 najtežu frakciju. Frakcije 1 i 2 predstavljaju prvi prsten (kasne endosome/lizosome), frakcije 4 i 5 drugi prsten (rane endosome), a frakcija 9 treći prsten (tešku frakciju). Rezultati dobiveni metodom Western blot kvantificirani su programom Image J, a dobivene vrijednosti između miševa NPC1 i wt su prikazane grafički.





**Slika 21. Prikaz karakterističnih prstenova dobivenih frakcioniranjem endolizosoma metodom ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu saharoze.** Moždane regije hipokampusa i malog mozga miševa wt i NPC1 su homogenizirane, a dobiveni PNS je razdvojen u diskontinuiranom gradijentu saharoze (8%, 25%, 35% i 40,6%-tne otopine saharoze). Prstenovi predstavljaju nakupljanje pojedinih organela koje su iste gustoća kao gustoća pojedine međufaze između otopina saharoze: 1. prsten između 8%-tne i 25%-tne otopine saharoze- kasni endosomi/lizosomi, 2. prsten između 25%-tne i 35%-tne otopine saharoze- rani endosomi, 3. prsten između 35%-tne i 40,6%-tne otopine saharoze- teška frakcija koja sadrži organele endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata.

Osim toga u izdvojenim endosomskim frakcijama malog mozga i hipokampusa miševa NPC1 i wt izmjerena je razina slobodnog kolesterola. Slobodni kolesterol je izmjerena u frakcijama koje sadrže karakteristične prstenove dobivene nakon ultracentrifugiranja: 1. prsten- spojene frakcije 1 i 2 (kasni endosomi/lizosomi), 2. prsten- frakcije 4 i 5 (rani endosomi), 3. prsten- frakcija 9 (teška frakcija). Frakcije kasnih endosoma/lizosoma (LE/L) miševa wt i NPC1 imaju povećanu razinu slobodnog kolesterola u odnosu na ostale frakcije (EE, HF) u malom mozgu i hipokampusu miševa wt i NPC1 (Slika 22.). Nadalje, razina slobodnog kolesterola u frakciji kasnih endosoma/lizosoma u malom mozgu i hipokampusu miševa NPC1 je viša u odnosu na njegovu razinu u istim frakcijama izdvojenim iz wt miševa, ukazujući na karakteristično nakupljanje slobodnog kolesterola u ovim organelima u bolesti NPC te na uspješno razdvajanje endolizosomalnih vezikula metodom ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu saharoze. Međutim, uočeno povećanje slobodnog kolesterola u LE/L NPC1 u odnosu na wt miševe nije statistički značajno.



**Slika 22. Slobodni kolesterol se nakuplja u frakcijama kasnih endosoma/lizosoma u malom mozgu i hipokampusu 4 tjedna starih miševa wt i NPC1.** U frakciji kasnih endosoma/lizosoma (LE, 1. prsten), ranih endosoma (EE, 2. prsten) i teškoj frakciji (HF, 3. prsten) izmjerena je koncentracija slobodnog kolesterola komercijalno dostupnim kompletom Amplex Red Cholesterol Assay te je izražena kao omjer koncentracije slobodnog kolesterola i koncentracije proteina u frakcijama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

#### 4.5.1. Analiza raspodjele i razine biljega endolizosomalnog puta u razdvojenim endolizosomskim frakcijama malog mozga 4 tjedna starih miševa wt i NPC1

S obzirom da bolest NPC karakterizira disfunkcija lizosoma, što uključuje značajno povećane vezikule lizosoma te u njima nakupljanje proteina, lipida i drugih makromolekula, pretpostavili smo da će biljeg lizosoma LAMP1 imati značajno promijenjenu raspodjelu u izdvojenim frakcijama endolizosoma miševa NPC1 u odnosu na wt. Međutim, zanimljivo je da je biljeg lizosoma LAMP1 pokazao sličnu raspodjelu između frakcija malog mozga miševa NPC1 i wt. U oba genotipa najjači signali proteinskog biljega LAMP1 su utvrđeni u lakšim frakcijama- frakcijama 1 i 2, te u frakciji 4. Intenzitet signala u oba genotipa je podjednak u frakcijama 1 i 2, dok je u frakciji 4 intenzitet signala jači u miševima NPC1 u odnosu na wt (Slika 23. B).

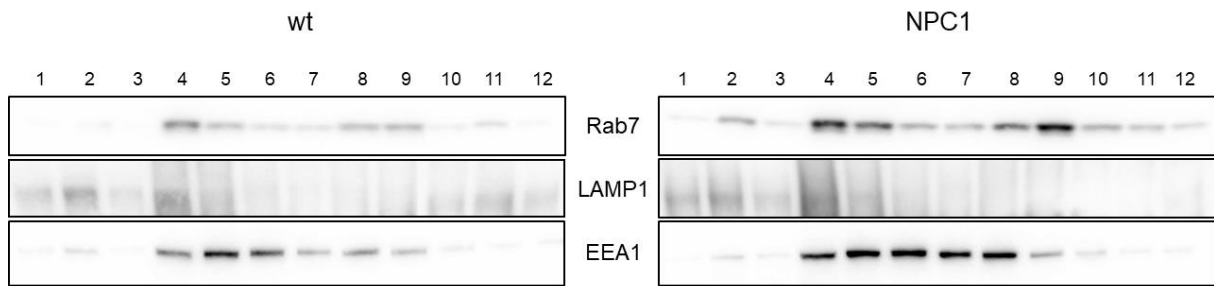
Analiza proteinskih biljega kasnih endosoma (Rab7) i ranih endosoma (EEA1) je, za razliku od biljega LAMP1, pokazala njihovu promijenjenu raspodjelu u endolizosomskim frakcijama izdvojenim iz malog mozga 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt. Za biljeg Rab7 smo utvrdili njegovu širu raspodjelu u frakcijama 4-9 u malom mozgu miševima NPC1 i

wt, s tim da je intenzitet signala Rab7 bio jači u frakcijama NPC1 u odnosu na frakcije wt miševa, a najjači signal je zamijećen u frakciji 4 i u NPC1 i u wt miševa (Slika 23. A i B). Za razliku od wt miševa u malom mozgu miševa NPC1 Rab7 je utvrđen i u lakšim frakcijama- frakciji 2, ukazujući na nakupljanje lakših vezikula kasnih endosoma u malom mozgu miševa NPC1 u odnosu na wt miševima (vjerojatno uslijed nakupljanja slobodnog kolesterola i drugih lipida kao posljedice bolesti NPC) (Slika 23. A).

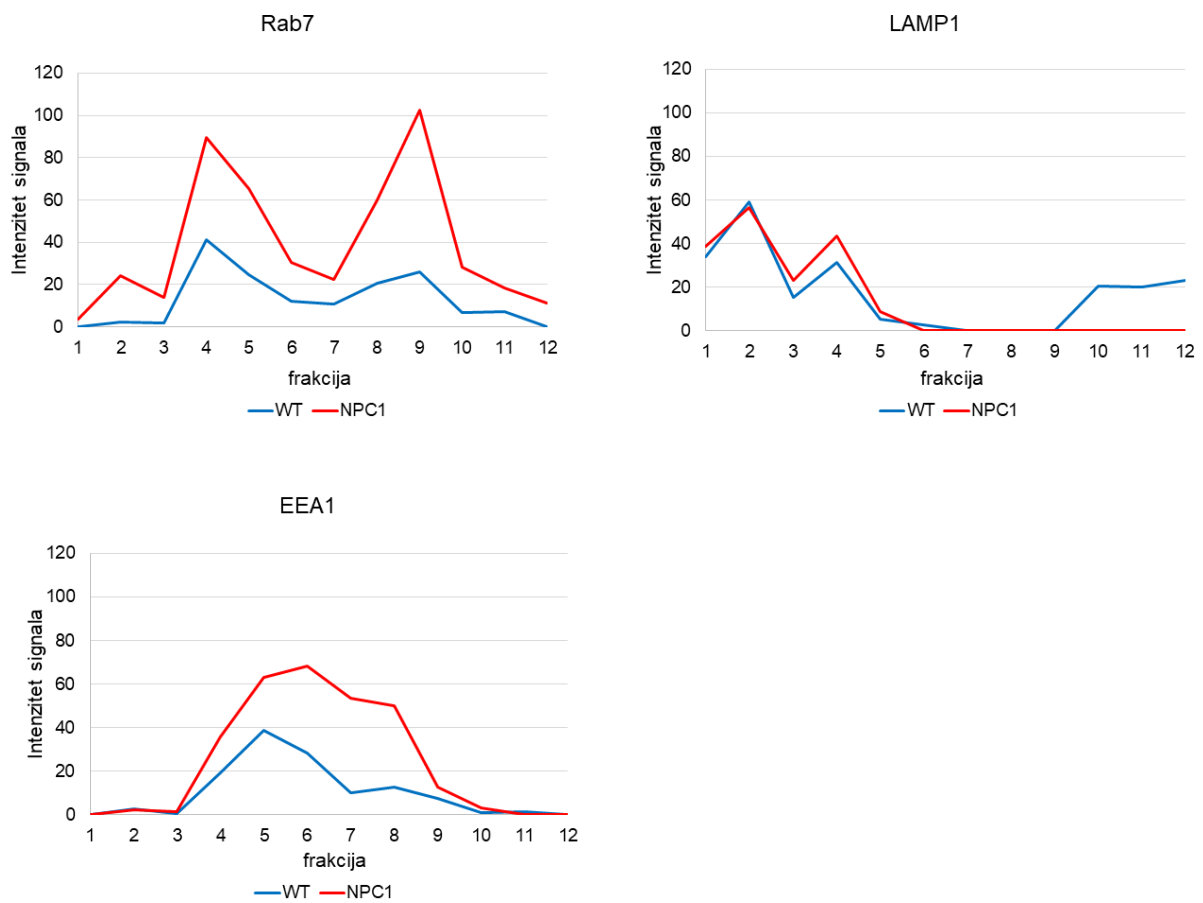
Kao i biljeg kasnih endosoma Rab7, biljeg ranih endosoma EEA1 je pokazao nešto širu raspodjelu u frakcijama 4-8 izdvojenim iz malog mozga miševa NPC1 i wt (Slika 23. A). Međutim, intenzitet signala biljega ranih endosoma EEA1 je bio jači u frakcijama malog mozga miševa NPC1 u odnosu na wt (Slika 23. B), ukazujući na nakupljanje ovih organela u malom mozgu miševa NPC1 te da je, osim disfunkcije kasnih endosoma, u malom mozgu miševa NPC1 prisutno i nakupljanje vezikula ranih endosoma. U miševima wt najjači signal za biljeg ranih endosoma - EEA1 je utvrđen u frakciji 5, dok je u miševima NPC1 najjači signal detektiran u frakciji 6.

Analizom raspodjele proteinskih biljega endolizosomalnih vezikula u malom mozgu pokazano je uspješno razdvajanje vezikula lizosoma (LAMP1), koji su bili prisutni u lakšim frakcijama (1 i 2), od ranih endosoma (EEA1) koji su utvrđeni u sredini gradijenta (frakcijama 4-8). Biljeg kasnih endosoma (Rab7) je, kao i biljeg EEA1, pokazao nešto širu distribuciju u gradijentu i djelomično preklapanje prvenstveno sa biljekom ranih endosoma (prvenstveno u frakcijama 4 i 5) što je vjerojatno posljedica dinamičnog procesa sazrijevanja ranih endosoma u kasne endosome. Stoga su neke frakcije bile pozitivne na oba biljega. No unatoč tome, najjači signali ovih biljega se nisu preklapali. Posebno se ističe signal biljega kasnih endosoma Rab7 u lakšoj frakciji NPC1 miševa (frakciji 2) koja nije utvrđena u frakcijama izdvojenim iz malog mozga wt miševa. Sumarno, dobiveni rezultati pokazali su različitu raspodjelu i intenzitet vezikula endolizosomalnog puta, naročito biljega ranih i kasnih endosoma (biljega EEA1 i Rab7), u malom mozgu 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt, ukazujući na poremećaj biogeneze endolizosoma već u asimptomatskoj fazi bolesti.

A)



B)



**Slika 23. Raspodjela i razina biljega endolizosomalnog puta promijenjena je u endolizosomskim frakcijama malog mozga 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt.** Nakon ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze dvanaest frakcija (po 1 ml) sakupljeno je s vrha gradijenta i analizirano metodom Western blot. Frakcije su označene brojevima od 1-12. Frakcije 1 i 2 predstavljaju frakcije kasnih endosoma/lizosoma (1. prsten), frakcije 4 i 5-rane endosome (2. prsten) i frakcija 9-tešku frakciju (3. prsten). A) Metodom Western blot analizirani su proteinski biljezi kasnih endosoma (Rab7), lizosoma (LAMP1) i ranih endosoma (EEA1). B) Grafički prikazi kvantificiranih proteinskih signala Rab7, LAMP1 i EEA1 u svakoj frakciji između miševa wt i NPC1, dobiveni kvantificiranjem signala programom Image J.

#### 4.5.2. Analiza raspodjele i razine enzima BACE1 i njegovih supstrata u razdvojenim endolizosomskim frakcijama malog mozga 4 tjedna stari miševa NPC1 i wt

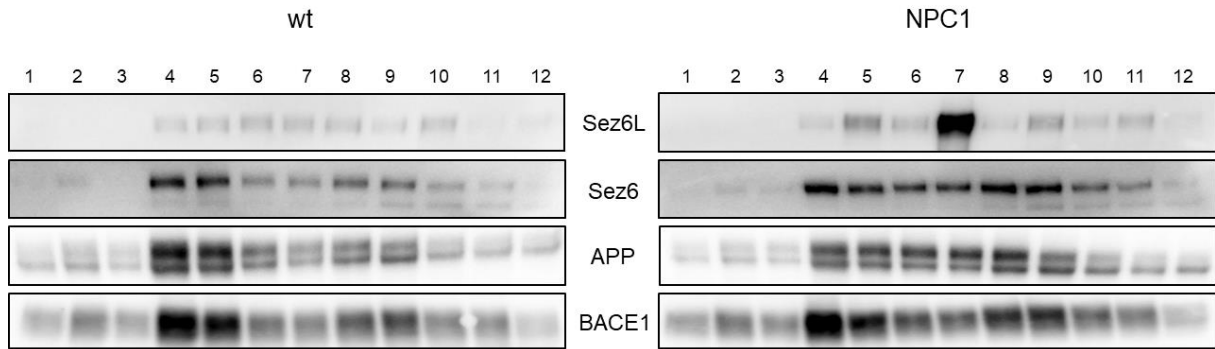
S obzirom da su rezultati na mišjim primarnim kulturama neurona ukazali na promijenjen transport supstrata enzima BACE1 i njihovo nakupljanje u vezikulama ranih endosoma u procesima NPC1 u odnosu na wt neurone, ispitali smo je li uočen poremećaj prisutan i u moždanom tkivu, tj. u izdvojenim endolizosomskim frakcijama malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt miševe. Stoga smo analizirali raspodjelu enzima BACE1 i njegovih supstrata- proteina Sez6L, Sez6 i APP u dobivenim frakcijama miševa NPC1 i wt.

Protein Sez6L pokazao je različitu razinu i raspodjelu u frakcijama malog mozga između 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt (Slika 24. A). U miševima wt podjednako niska razina proteina Sez6L je utvrđena u frakcijama 4-10, dok je u frakcijama miševa NPC1 uočeno značajno nakupljanje Sez6L u frakciji 7, te u frakciji 5 (Slika 24. A i B). Frakcije 5 i 7 izdvojene iz malog mozga miševa NPC1 su pokazale jaki signal za proteinski biljeg ranih endosoma - EEA1, ukazujući na nakupljanje proteina Sez6L u vezikulama ranih endosoma u malom mozgu 4 tjedna starih miševima NPC1 u odnosu na wt miševe.

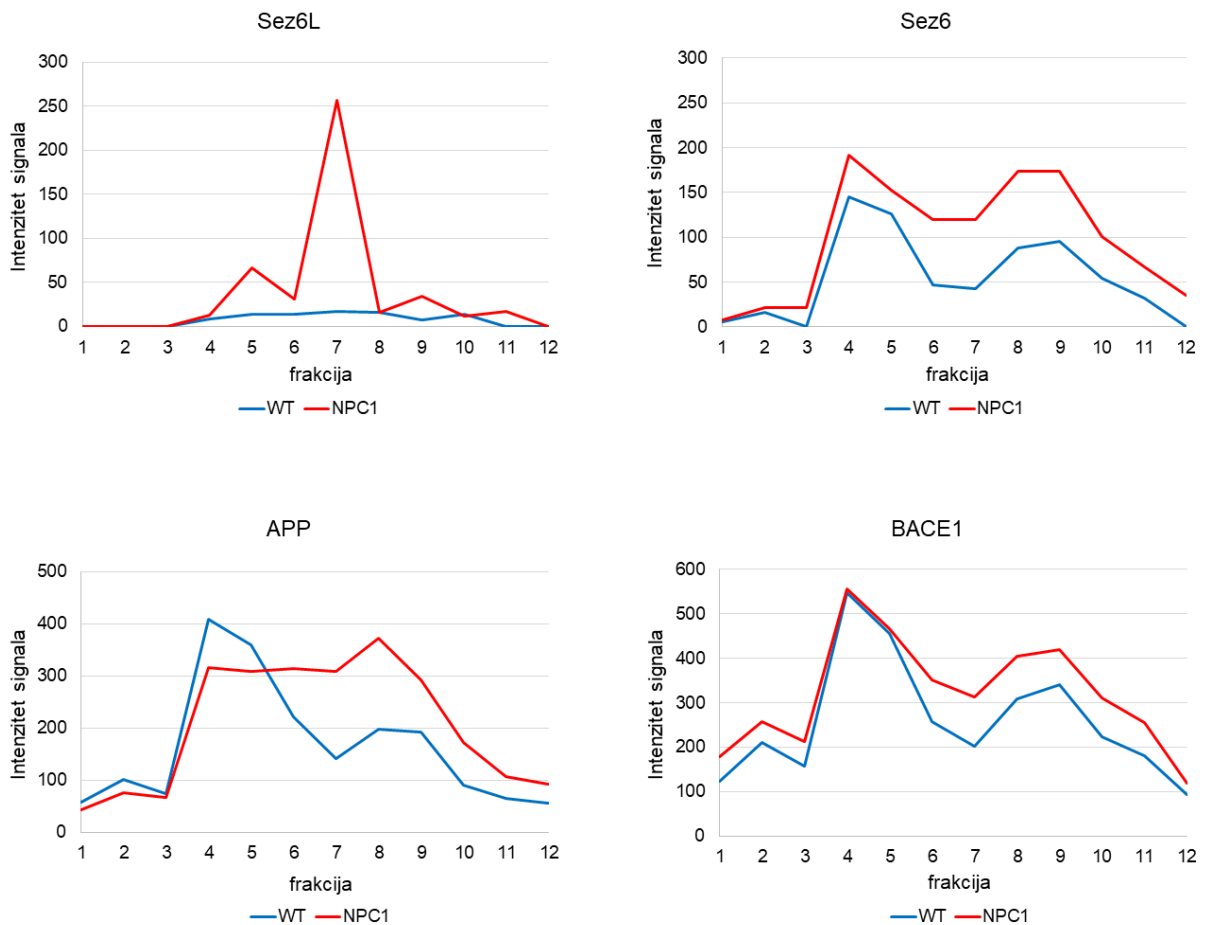
Drugi isključivi fiziološki supstrat proteaze BACE1, protein Sez6 nije pokazao sličnu razliku u raspodijeli između miševa NPC1 i wt kao onu utvrđenu za protein Sez6L (Slika 24. A). Naime, u frakcijama wt miševa uočen je najjači signal Sez6 u frakcijama 4 i 5, dok je ovaj signal bio skoro podjednakog intenziteta prisutan u frakcijama 4, 8 i 9 u uzorku malog mozga miševa NPC1 (Slika 24. A i B). S obzirom da su frakcije 4-9 dobivene iz malog mozga miševa NPC1 pozitivne na biljeg EEA1 (Slika 23. A i B), ovaj rezultat ukazuje na nakupljanje Sez6 u ranim endosomima u malom mozgu miševa NPC1 u odnosu na wt miševe. Međutim, iako smo za Sez6 i Sez6L utvrdili njihovo potencijalno nakupljanje u frakcijama malog mozga miševa NPC1 pozitivnim na biljeg ranih endosoma, ova dva isključiva BACE1 supstrata su pokazala razliku u njihovoj endolizosomskoj raspodijeli u malom mozgu između miševa wt i NPC1. Treći analizirani supstrat enzima BACE1, protein APP, je pokazao sličnu raspodjelu kao i protein Sez6 u wt i u NPC1 frakcijama malog mozga. Dok je najjači signal u miševima wt utvrđen u frakcijama 4 i 5, u miševima NPC1 jak signal je prisutan u frakcijama 4-9 (Slika 24. A i B). Slično raspodijeli proteina Sez6 i APP, BACE1 je dao najjači signal u frakcijama 4 i 5 malog mozga 4 tjedna starih wt miševa, dok je u uzorcima miševa NPC1 njegova distribucija bila raspršena između frakcija 4-9 koje odgovaraju frakcijama pozitivnim na biljeg ranih

endosoma EEA1 (Slika 24. A i B). Dobiveni rezultati pokazali su razliku u raspodijeli supstrata BACE1, posebice proteina Sez6L u endolizosomskim frakcijama između miševa NPC1 i wt, ukazujući na njihov različit transport u endolizosomalnom putu u malom mozgu miševa NPC1.

**A)**



**B)**



**Slika 24. Raspodjela i razina supstrata BACE1 u endolizosomskim frakcijama malog mozga 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt.** Nakon ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze dvanaest frakcija (po 1 ml) sakupljeno je s vrha gradijenta i analizirano metodom Western blot. Frakcije su označene brojevima od 1-12. Frakcije 1 i 2 predstavljaju frakcije kasnih endosoma/lizosoma (1. prsten), frakcije 4 i 5-rane endosome (2. prsten) i frakcija 9-tešku frakciju (3. prsten). A) Metodom Western blot analizirani su supstrati BACE1- proteini Sez6L, Sez6, APP te proteaza BACE1. B) Grafički prikazi kvantificiranih proteinskih signala Sez6L, Sez6, APP i BACE1 u svakoj frakciji između miševa wt i NPC1, dobiveni kvantificiranjem signala programom Image J.

#### 4.5.3. Analiza raspodjele i razine biljega endolizosomalnog puta u razdvojenim endolizosomskim frakcijama hipokampusu 4 tjedna stari miševa NPC1 i wt

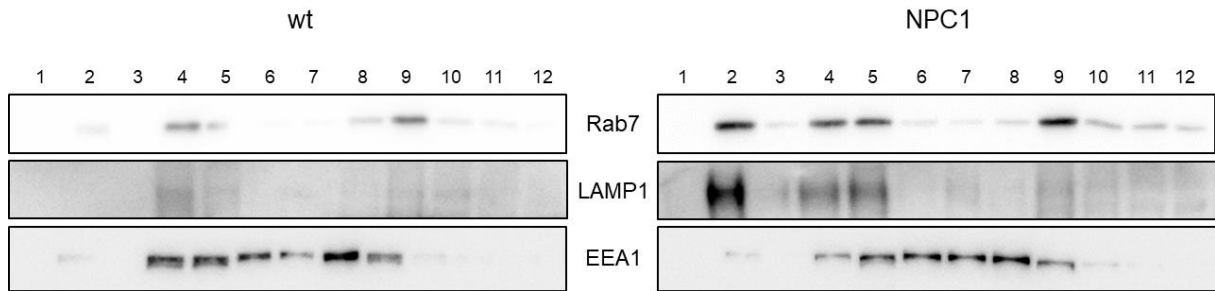
U izdvojenim frakcijama dobivenim ultracentrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze iz tkiva hipokampusu, metodom Western blot analizirani su proteinski biljezi vezikula endolizosomalnog puta- kasnih endosoma (Rab7), lizosoma (LAMP1) i ranih endosoma (EEA1) u 4 tjedna starim miševima NPC1 i wt.

Suprotno rezultatima dobiveni za biljeg LAMP1 u frakcijama malog mozga 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt, u hipokampusu je uočena jasna razlika u raspodjeli i intenzitetu signala biljega LAMP1 između miševa NPC1 i wt. Najjači signal biljega lizosoma LAMP1 u miševima NPC1 utvrđen je u frakciji 2 (kao i biljega kasnih endosoma Rab7), dok u miševima wt LAMP1 nije utvrđen u lakšim frakcijama, nego je njegov signal zaostao u frakciji 4 (Slika 25. A). Intenzitet signala biljega lizosoma LAMP1 je jači u frakcijama miševa NPC1 u odnosu na wt (Slika 25. B). Slično rezultatima dobivenim na izdvojenim frakcijama iz malog mozga 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt, biljeg kasnih endosoma (Rab7) pokazao je jasan pomak u raspodjeli i nakupljanje u frakciji 2 u uzorku hipokampusu NPC1 u odnosu na njegovu raspodjelu u hipokampusu wt miševa (Slika 25. A). Također, intenzitet signala biljega Rab7 bio je jači u frakcijama miševa NPC1 u odnosu na wt (Slika 25. B). Za razliku od prethodno uočenog različitog intenziteta i raspodjele biljega EEA1 u endolizosomskim frakcijama malog mozga 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt, u frakcijama hipokampusu nismo utvrdili razliku u raspodjeli i jačini signala EEA1 između 4 tjedana starih miševa NPC1 i wt (Slika 25. A i B). Naime, u endolizosomskim frakcijama izdvojenim iz hipokampusu 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt utvrđen je EEA1 signal podjednakog intenziteta između frakcija 4-9.

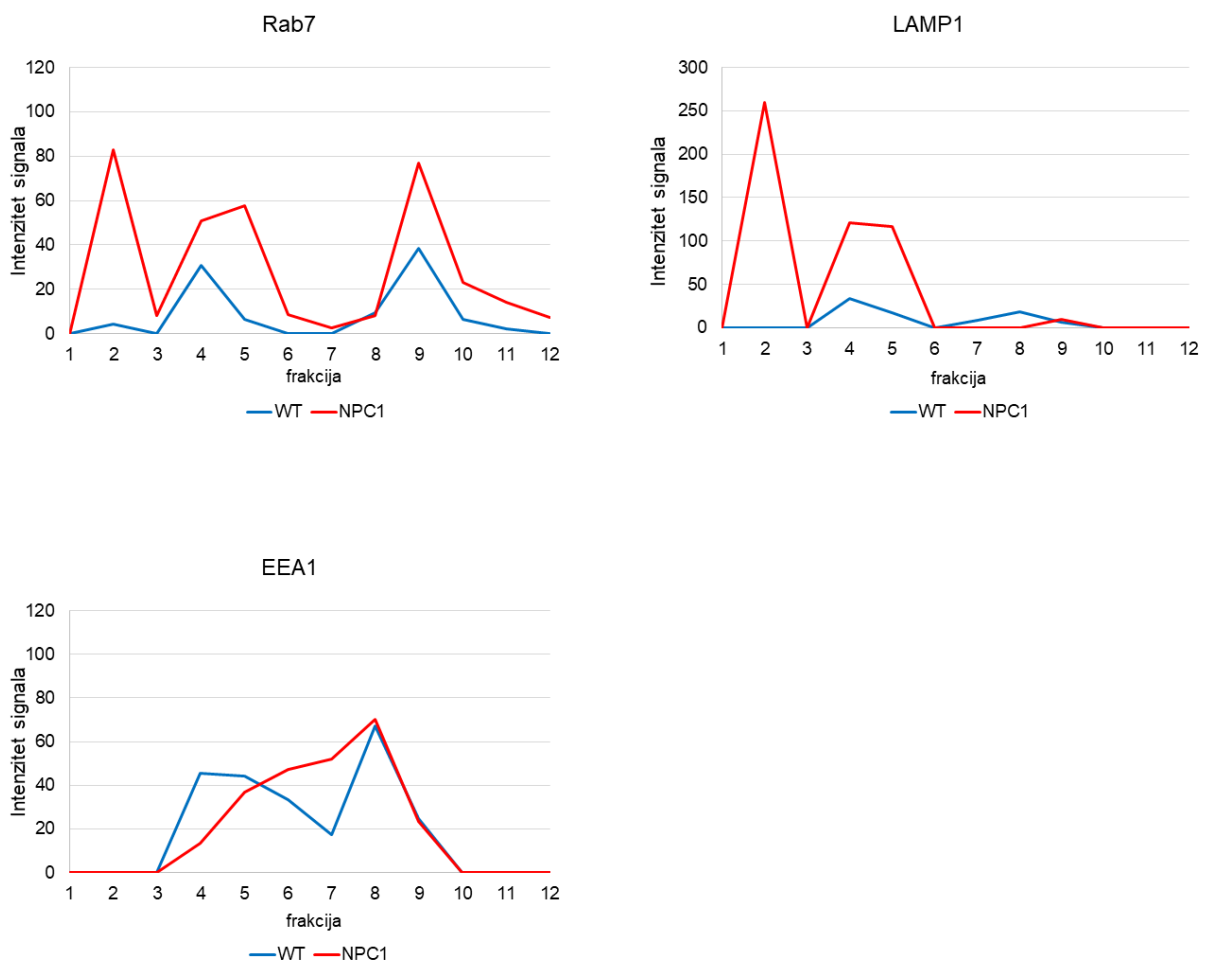
Sumarno, dobiveni rezultati pokazali su jasnu razliku u raspodjeli i/ili razini biljega kasnih endosoma i lizosoma u hipokampusu 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt, dok

je raspodjela i razina signala biljega ranih endosoma u ovom uzorku između miševa NPC1 i wt bila podjednaka.

**A)**



**B)**





**Slika 25. Raspodjela i razina biljega endolizosomalnog puta promijenjena je u endolizosomskim frakcijama hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt.** Nakon ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze dvanaest frakcija (po 1 ml) sakupljeno je s vrha gradijenta i analizirano metodom Western blot. Frakcije su označene brojevima od 1-12. Frakcije 1 i 2 predstavljaju frakcije kasnih endosoma/lizosoma (1. prsten), frakcije 4 i 5-rane endosome (2. prsten) i frakcija 9-tešku frakciju (3. prsten). A) Metodom Western blot analizirani su proteinski biljezi kasnih endosoma (Rab7), lizosoma (LAMP1) i ranih endosoma (EEA1). B) Grafički prikazi kvantificiranih proteinskih signala Rab7, LAMP1 i EEA1 u svakoj frakciji između miševa wt i NPC1, dobiveni kvantificiranjem signala programom Image J.

#### 4.5.4. Analiza raspodjele i razine enzima BACE1 i njegovih supstrata u razdvojenim endolizosomskim frakcijama hipokampusa 4 tjedna stari miševa NPC1 i wt

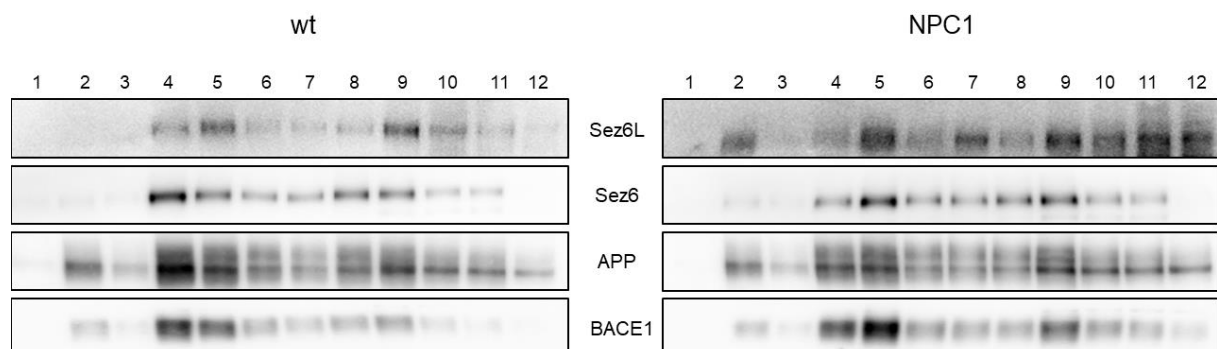
Protein Sez6L pokazao je različitu razinu i raspodjelu u endolizosomskim frakcijama izoliranim iz tkiva hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt (Slika 26. A i B). Dok je u hipokampusu i miševa wt i NPC1 najjači signal Sez6L utvrđen u frakciji 5, u frakcijama miševa NPC1 za razliku od wt uzorka Sez6L je prisutan i u frakciji 2, koja predstavlja frakciju kasnih endosoma i lizosoma. Također, u skladu s rezultatima raspodjele Sez6L u frakcijama malog mozga, jak Sez6L signal uočen je i u frakciji 7 hipokampusa miševa NPC1 u odnosu na wt miševu. Nadalje, intenzitet signala proteina Sez6L bio je povećan u frakcijama miševa NPC1 u odnosu na wt miševu (Slika 26. B).

Protein Sez6 nije pokazao značajnu razliku u raspodjeli u frakcijama endolizosomalnog puta između hipokampusa miševa NPC1 i wt. U oba genotipa za protein Sez6 najjači signali su utvrđeni u frakcijama ranih endosoma (2. prsten, frakcije 4/5), a intenzitet signala u ovim frakcijama je bio podjednak između genotipova. U miševima wt najjači signal utvrđen je u frakciji 4, a kod miševa NPC1 u frakciji 5 (Slika 26. A). Intenzitet signala proteina Sez6 u frakcijama 6-11 bio je nešto veći u miševima NPC1 u odnosu na miševu wt (Slika 26. B).

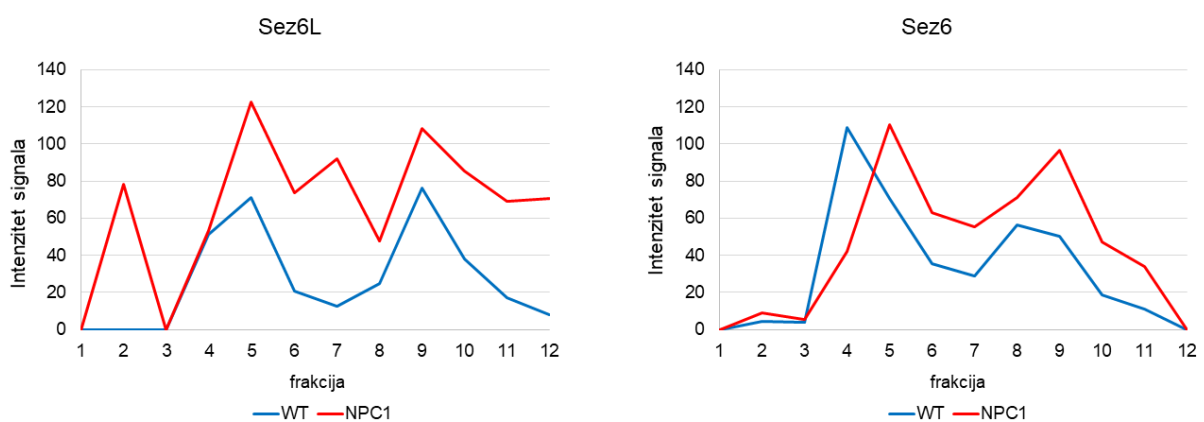
Protein APP pokazao je sličnu raspodjelu u gradijentu između hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt. Najjači signali u endolizosomskim frakcijama u miševima wt utvrđeni su u frakcijama 2 i 4, dok je kod miševa NPC1 najjači signal utvrđen u frakcijama 2 i 5 (Slika 26. A). Također, kao i za Sez6 i APP, za enzim BACE1 je uočena slična raspodjela u endolizosomskim frakcijama hipokampusa između genotipova. Najjači signali u oba genotipa su utvrđeni u frakcijama ranih endosoma: u frakciji 4 u miševima wt, odnosno u frakciji 5 u miševima NPC1 (Slika 26. A).

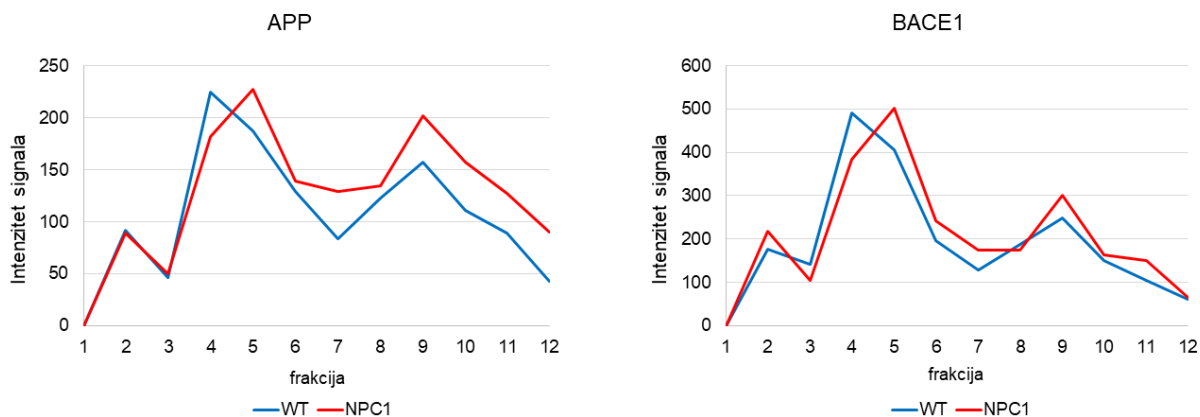
Proteini Sez6, APP i enzim BACE1 pokazuju isti trend raspodjele u gradijentu uzoraka hipokampusa u oba genotipa. Jedini protein koji ne pokazuje takvu raspodjelu je Sez6L i čija se raspodjela značajno razlikuje između miševa NPC1 i wt ukazujući na promijenjen transport ovog proteina i u hipokampusu 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt. Iako se hipokampus smatra regijom mozga koja je zaštićena, tj. najmanje zahvaćena patologijom bolesti NPC, ovi rezultati su pokazali da postoje promjene u raspodijeli organela endolizosomalnog puta kao i proteina Sez6L u izdvojenim frakcijama iz tkiva hipokampusa između miševa NPC1 i wt već u 4 tjedna starih miševa koji su asimptomatski, tj. fenotipski su zdravi i nemaju razvijenu patologiju.

**A)**



**B)**





**Slika 26. Raspodjela i razina supstrata BACE1 u endolizosomskim frakcijama hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt.** Nakon ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze dvanaest frakcija (po 1 ml) sakupljeno je s vrha gradijenta i analizirano metodom Western blot. Frakcije su označene brojevima od 1-12. Frakcije 1 i 2 predstavljaju frakcije kasnih endosoma/lizosoma (1. prsten), frakcije 4 i 5-rane endosome (2. prsten) i frakcija 9-tešku frakciju (3. prsten). A) Metodom Western blot analizirani su supstrati enzima BACE1- proteini Sez6L, Sez6, APP i proteaza BACE1. B) Grafički prikazi kvantificiranih proteinskih signala Sez6L, Sez6, APP i BACE1 između miševa wt i NPC1, dobivenih korištenjem programa Image J.

#### **4.6. Analiza lipidoma u moždanim regijama i u frakcijama ranih endosoma hipokampusa i malog mozga miševa NPC1 i wt**

S obzirom da je nakupljanje kolesterola i drugih lipida u kasnim endosomima/lizosomima primarna značajka bolesti NPC, ispitano je postoji li razlika u raspodijeli lipidnih vrsta između malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt i doprinosi li ta razlika specifičnoj regionalnoj osjetljivosti na neurodegeneraciju u bolesti NPC. Također, osim u homogenatima moždanih regija raspodjela i razina lipidnih vrsta analizirana je i u frakcijama ranih endosoma izoliranim iz tkiva malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt, kako bismo ispitali postoje li razlike u raspodijeli i razini lipidnih vrsta u organelima koje predstavljaju središnje mjesto cijepanja proteaze BACE1. Za analizu su odabrane moždane regije malog mozga i hipokampusa zbog različite vulnerabilnosti neurona u ovim regijama, tj. pojave neurodegeneracije karakteristične za bolest NPC. Naime, poznato je da prvo u malom mozgu dolazi do specifičnog odumiranja Purkinjeovih neurona, dok su neuroni hipokampusa čini se očuvani te se hipokampus smatra najmanje pogođenom regijom mozga u bolesti NPC. Također, odabrani su miševi stari 4 tjedna koji su fenotipski zdravi i ne pokazuju simptome bolesti, kako bi se utvrdile najranije promjene lipidnih vrsta, tj. potencijalne okidače progresije bolesti NPC. Analiza lipidoma napravljena je u suradnji s kompanijom Lipotype GmbH (Dresden, Njemačka) korištenjem metode shotgun lipidomike koja se sastoji od automatizirane lipidne ekstrakcije u uzorcima, automatizirane izravne infuzije uzoraka i masene spektrometrije visoke rezolucije te apsolutne kvantifikacije lipida ([www.lipotype.com](http://www.lipotype.com)). Dobiveni podaci su normalizirani prema internim standardima i prema ukupnoj količini lipida u uzorku, što je omogućilo međusobnu usporedbu uzoraka s različitom količinom ukupnih lipida.

Podatci dobiveni masenom spektrometrijom nisu bili normalno raspoređeni, stoga je za statističku obradu korišten neparametrijski Kruskal-Wallis test, a Dunn's post hoc testom su utvrđene statistički značajne razlike. Popis analiziranih lipida nalazi se u Tablici 10., u daljnjem tekstu će se za nazive lipida koristiti kratice navedene u Tablici 10.

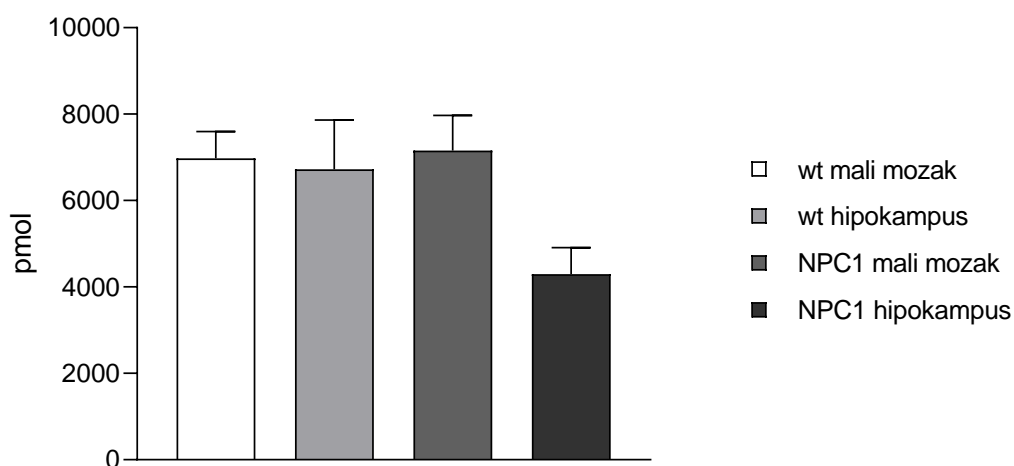
**Tablica 10.** Popis analiziranih lipidnih razreda.

RAZRED		GRUPA	KATEGORIJA
Puni naziv	Kratica		
Kardiolipin	CL	Difosfatidilgliceroli	Fosfolipidi
Lizo-fosfatidat	LPA	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Lizo-fosfatidilkolin	LPC	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Lizo-fosfatidilkolin eter	LPC O <sup>-</sup>	Eteri fosfolipida	Fosfolipidi
Lizo-fosfatidiletanolamin	LPE	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Lizo-fosfatidiletanolamin eter	LPE O <sup>-</sup>	Eteri fosfolipida	Fosfolipidi
Lizo-fosfatidilglicerol	LPG	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Lizo-fosfatidilinozitol	LPI	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Lizo-fosfatidilserin	LPS	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Fosfatidat	PA	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Fosfatidilkolin	PC	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Fosfatidilkolin eter	PC O <sup>-</sup>	Eteri fosfolipida	Fosfolipidi
Fosfatidiletanolamin	PE	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Fosfatidiletanolamin eter	PE O <sup>-</sup>	Eteri fosfolipida	Fosfolipidi
Fosfatidilglicerol	PG	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Fosfatidilinozitol	PI	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Fosfatidilserin	PS	Esteri fosfolipida	Fosfolipidi
Diacilglicerol	DAG	Glicerol ester	Glicerolipidi
Triacilglicerol	TAG	Ester glicerola	Glicerolipidi
Ceramidi	Cer	Ceramidni lipidi	Sfingolipidi
Heksozilceramid	HexCer	Cerebrozidi	Sfingolipidi
Sfingomijelin	SM	Fosfosfingolipidi	Sfingolipidi
Sulfatid	Sulf	Sulfoglikosfingolipid	Sfingolipidi

#### 4.6.1. Analiza lipidoma malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt

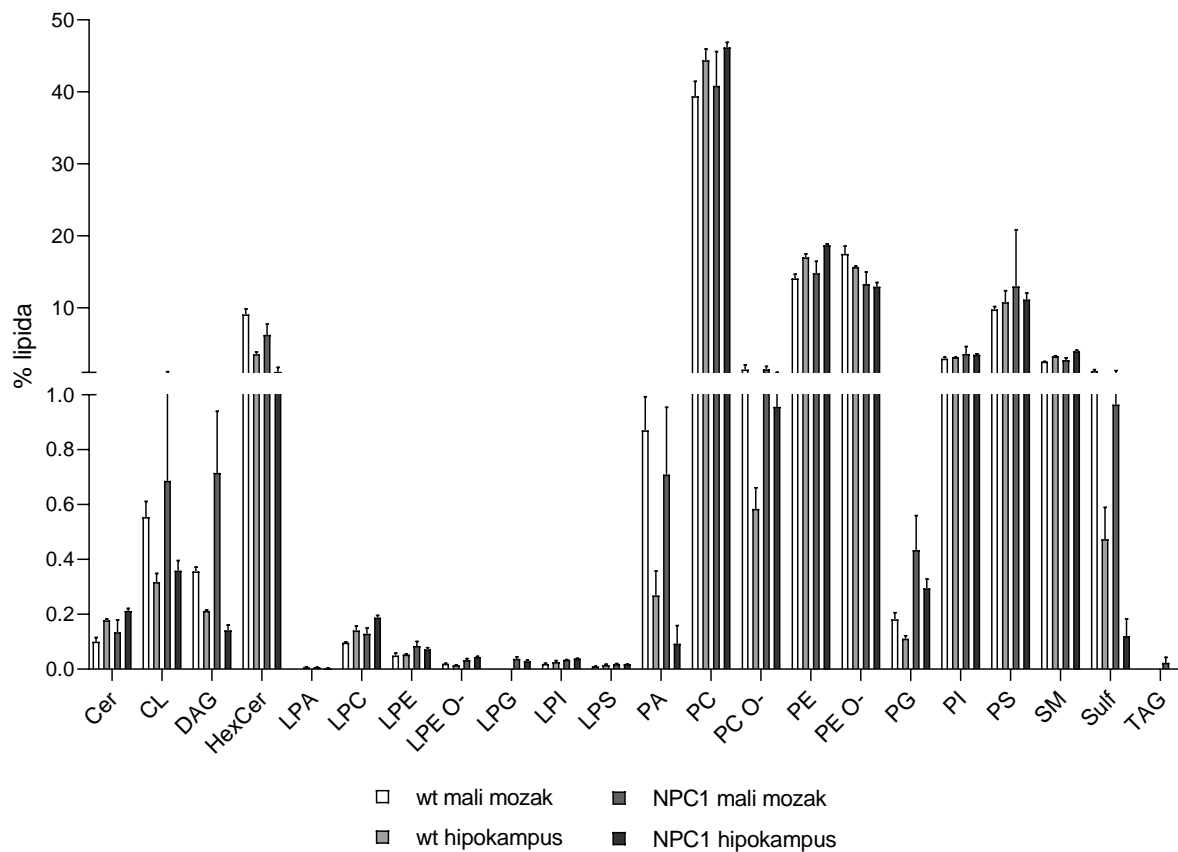
Homogenati tkiva malog mozga i hipokampus miševa NPC1 i wt pripremljeni su za analizu kako je opisano u poglavlju Materijali i metode 3.5.1.

Na početku analize izmjerena je ukupna količina lipida u svakom uzorku. Dobiveni rezultati su pokazali da ne postoji razlika u ukupnoj količini lipida u malom mozgu između miševa NPC1 i wt, dok je ukupna količina lipida u hipokampusu miševa NPC1 smanjena u odnosu na wt. Također, ukupna količina lipida u miševima wt između malog mozga i hipokampusa je podjednaka, dok je kod miševa NPC1 ukupna količina lipida u hipokampusu manja u odnosu na mali mozak, no razlika nije statistički značajna (Slika 27.).



**Slika 27. Ukupna količina lipida u malom mozgu i hipokampusu 4 tjedna starih miševa wt i NPC1.** Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri biološka replikata  $\pm$  SD. Dobivene vrijednosti analizirane su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom i nisu uočene statistički značajne razlike.

Analiza lipidnog sastava malog mozga i hipokampusa miševa wt i NPC1 pokazala je da su u malom mozgu i u hipokampusu miševa wt i NPC1 najviše zastupljeni (iznad 1%) lipidi PC, PE, PE O-, PS, PI, HexCer, SM (Slika 28.).



**Slika 28.** Lipidni sastav malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt. Količina pojedinog lipidnog razreda je normalizirana na ukupnu količinu lipida u pripadajućem uzorku i izražena je kao postotak lipida u uzorku. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri biološka replikata  $\pm$  SD.

Daljnji rezultati analize pokazali su da je fosfolipid LPG prisutan samo u malom mozgu i hipokampusu miševa NPC1 dok u uzorcima wt miševa nije utvrđen (Slika 29. A). Iako je količina LPG manja u hipokampusu u odnosu na mali mozak miševa NPC1 ta razlika nije statistički značajna. U miševima wt LPA je utvrđen samo u hipokampusu, u malom mozgu nije utvrđen, dok je u miševima NPC1 njegova količina u malom mozgu bila veća u odnosu na hipokampus bez statističke značajnosti (Slika 29. A). Količina fosfolipida LPE O- veća je u malom mozgu i hipokampusu miševa NPC1 u odnosu na wt (Slika 29. A). U hipokampusu miševa NPC1 količina LPE O- je značajno veća u odnosu na wt, dok u malom mozgu razlika između genotipova nije bila statistički značajna. Također, u uzorcima miševa NPC1 utvrđena je veća količina LPE O- u hipokampusu u odnosu na mali mozak, ali ta razlika nije pokazala statističku značajnost (Slika 29. A). Za fosfolipide LPE i LPC nisu uočene značajne razlike između analiziranih moždanih regija između miševa wt i NPC1, niti unutar istog genotipa

između malog mozga i hipokampusa. Iako su uočene veće količine fosfolipida, LPI u miševima NPC1 u malom mozgu i hipokampusu u odnosu na wt, te razlike nisu pokazale statističku značajnost. Također nisu uočene ni značajne razlike između malog mozga i hipokampusa za ove fosfolipide unutar istog genotipa. Premda nije utvrđena statistička značajnost, u malom mozgu miševa NPC1 uočena je veća količina fosfolipida LPS u odnosu na wt, dok u hipokampusu nisu uočene značajne razlike između miševa NPC1 i wt (Slika 29. A).

U malom mozgu i hipokampusu miševa NPC1 utvrđena je veća količina fosfolipida PG u odnosu na wt, no razlika u količini nije bila statistički značajna. Također, unutar istog genotipa između malog mozga i hipokampusa nisu uočene značajne razlike. Količina fosfolipida CL nije se razlikovala u istim moždanim regijama između miševa wt i NPC1. Za PC O- uočena je podjednaka količina u malom mozgu između miševa wt i NPC1 dok je u hipokampusu u miševima NPC1 njegova količina bila veća u odnosu na wt, no ove promjene nisu bile statistički značajne (Slika 29. A). Daljnja analiza fosfolipida pokazala je da je količina fosfolipida PC i PE podjednaka u istim moždanim regijama između miševa wt i NPC1, dok je količina PE O- bila veća u malom mozgu i hipokampusu miševa wt u odnosu na NPC1. Fosfolipid PA u oba genotipa pokazuje istu raspodjelu te nisu uočene značajne razlike između miševa NPC1 i wt, kao ni između različitih moždanih regija unutar istog genotipa, iako je količina u hipokampusu manja u odnosu na mali mozak. Analiza fosfolipida PI i PS pokazala je sličnu raspodjelu u malom mozgu i hipokampusu miševa wt i NPC1 gdje nisu uočene značajne razlike između istih moždanih regija između miševa wt i NPC1, niti unutar istog genotipa između malog mozga i hipokampusa (Slika 29. A).

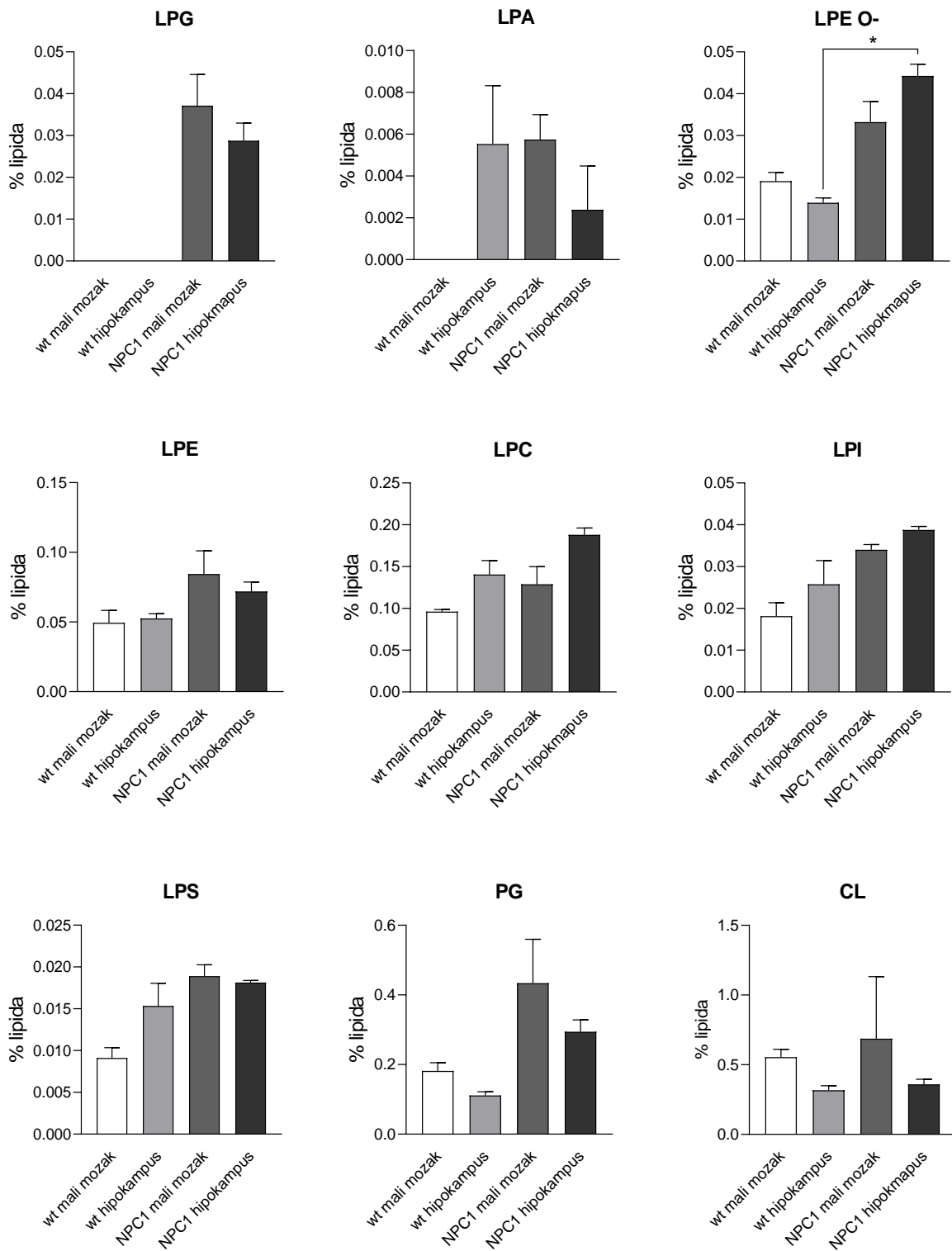
Druga kategorija analiziranih lipida su glicerolipidi koji su najzastupljeniji u malom mozgu miševa NPC1. TAG je detektiran samo u malom mozgu miševa NPC1 dok je količina DAG veća u malom mozgu miševa NPC1 u odnosu na wt. Također, u miševima NPC1 količina DAG je statistički značajno veća u malom mozgu u odnosu na hipokampus (Slika 29. B).

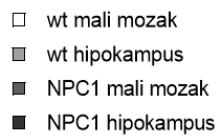
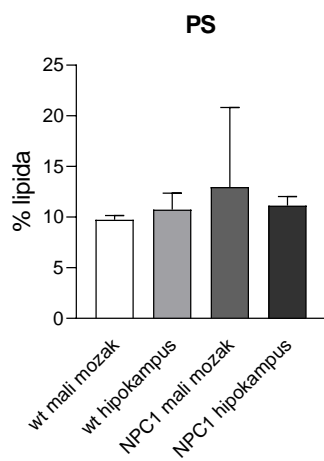
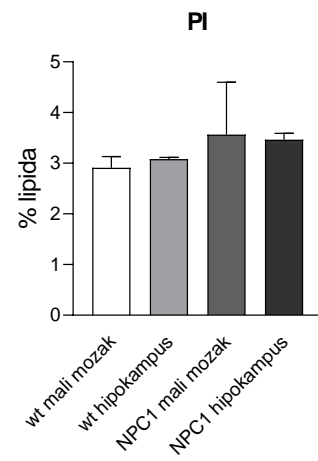
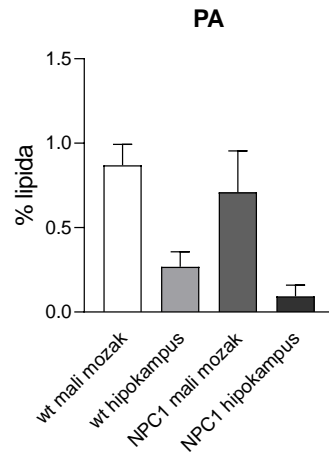
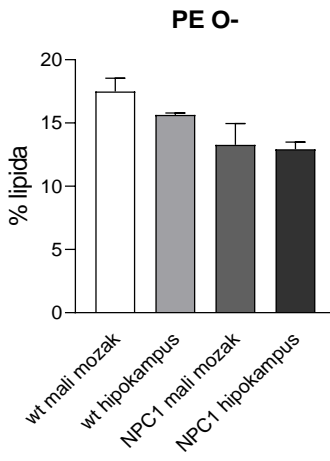
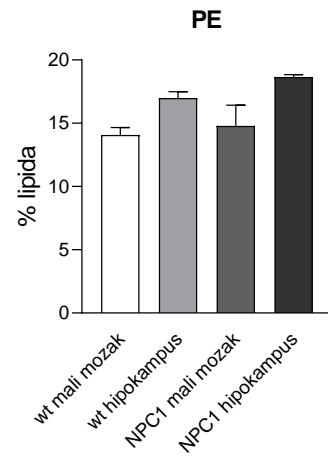
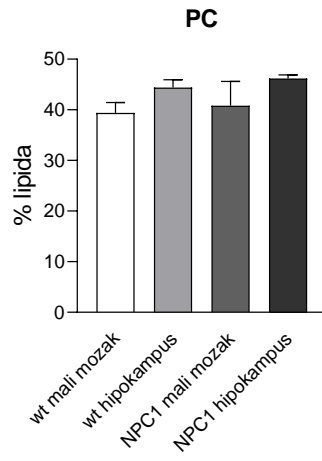
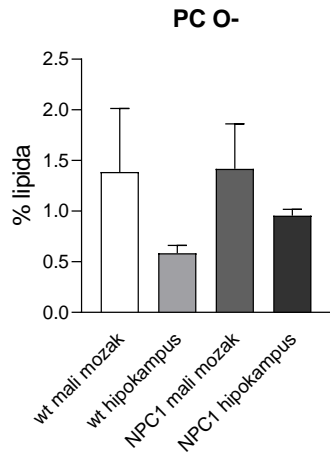
Iako nije pokazana statistička značajnost uspoređujući različite regije mozga unutar istog genotipa, vidljivo je da je u miševima wt i NPC1 u malom mozgu količina sfingolipida HexCer i Sulf veća nego u hipokampusu. Također nisu uočene značajne razlike za HexCer i Sulf između miševa wt i NPC1 uspoređujući iste regije mozga. Uočene razlike u količini sfingolipida Cer i SM u malom mozgu i hipokampusu između miševa NPC1 i wt nisu pokazale statističku značajnost. Također razlike između malog mozga i hipokampusa unutar istog genotipa nisu bile statistički značajne. (Slika 29. C).



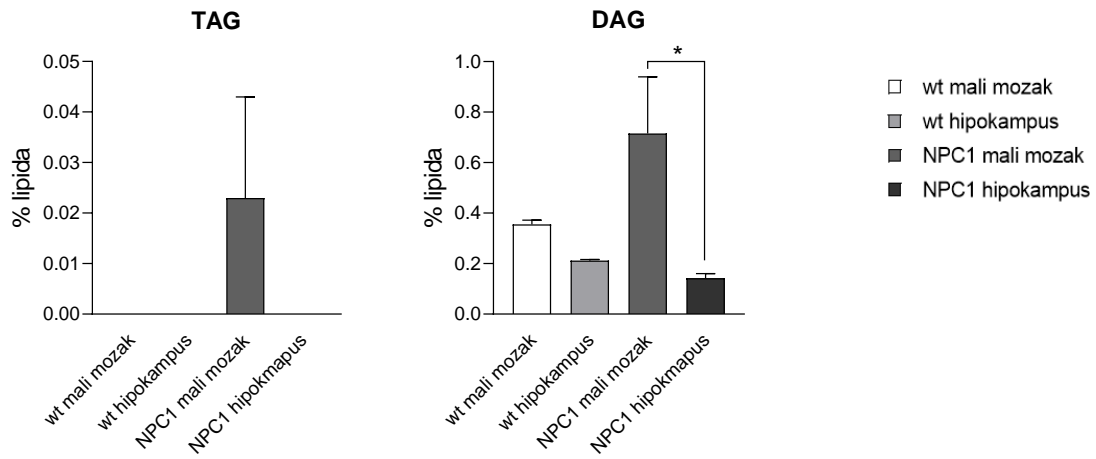
Analiza lipidnog sastava moždanih regija malog mozga i hipokampusu miševa wt i NPC1 pokazala je da u 4 tjedna starim miševima postoje razlike u raspodjeli i razini određenih lipidnih vrsta između miševa wt i NPC1, kao i između malog mozga i hipokampusu miševa NPC1, ukazujući na potencijalnu ulogu ovih lipida/lipidnih promjena u patogenezi bolesti NPC. Najznačajnije promjene u malom mozgu NPC1 u odnosu na wt miševima su detektirane u distribuciji lipida LPG, LPA, TAG te lipida LPG, LPE O- u hipokampusu miševa NPC1 u odnosu na wt miševima. Također, najznačajnije promjene u raspodjeli i razini lipida između moždanih regija malog mozga i hipokampusu miševa NPC1 su detektirane za DAG, a kod miševa wt za LPA.

A)

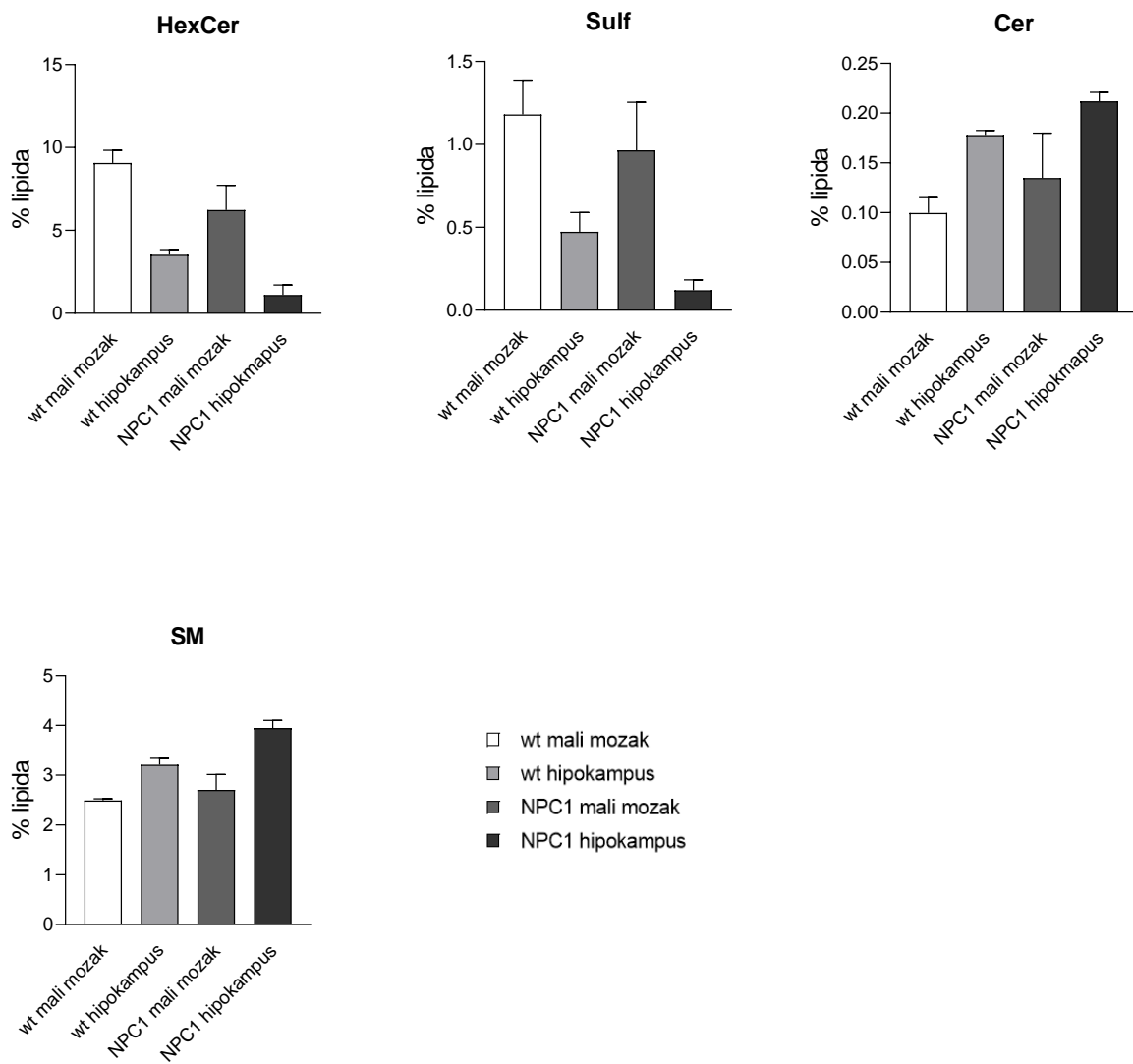




**B)**



**C)**

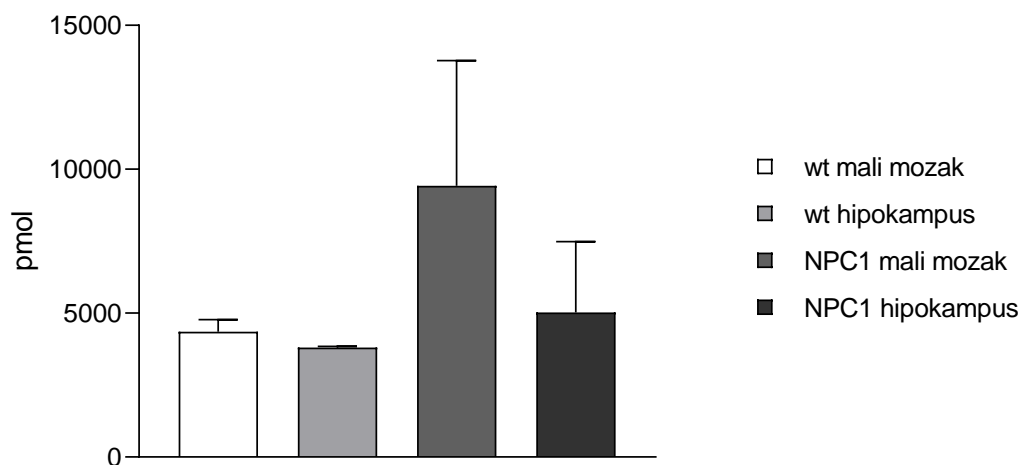


**Slika 29. Analiza lipidnih razreda u malom mozgu i hipokampusu 4 tjedna starih miševa wt i NPC1.**

Analizirani lipidni razredi su prikazani po kategorijama A) fosfolipidi, B) glicerolipidi, C) sfingolipidi. Lipidni razred je naveden iznad svakog grafa. Količina pojedinog lipidnog razreda je normalizirana na ukupnu količinu lipida u pripadajućem uzorku i izražena je kao postotak lipida u uzorku. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri biološka replikata  $\pm$  SD. Dobivene vrijednosti analizirane su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom a Dunn's *post hoc* testom su utvrđene statistički značajne razlike, \* $p < 0,05$ .

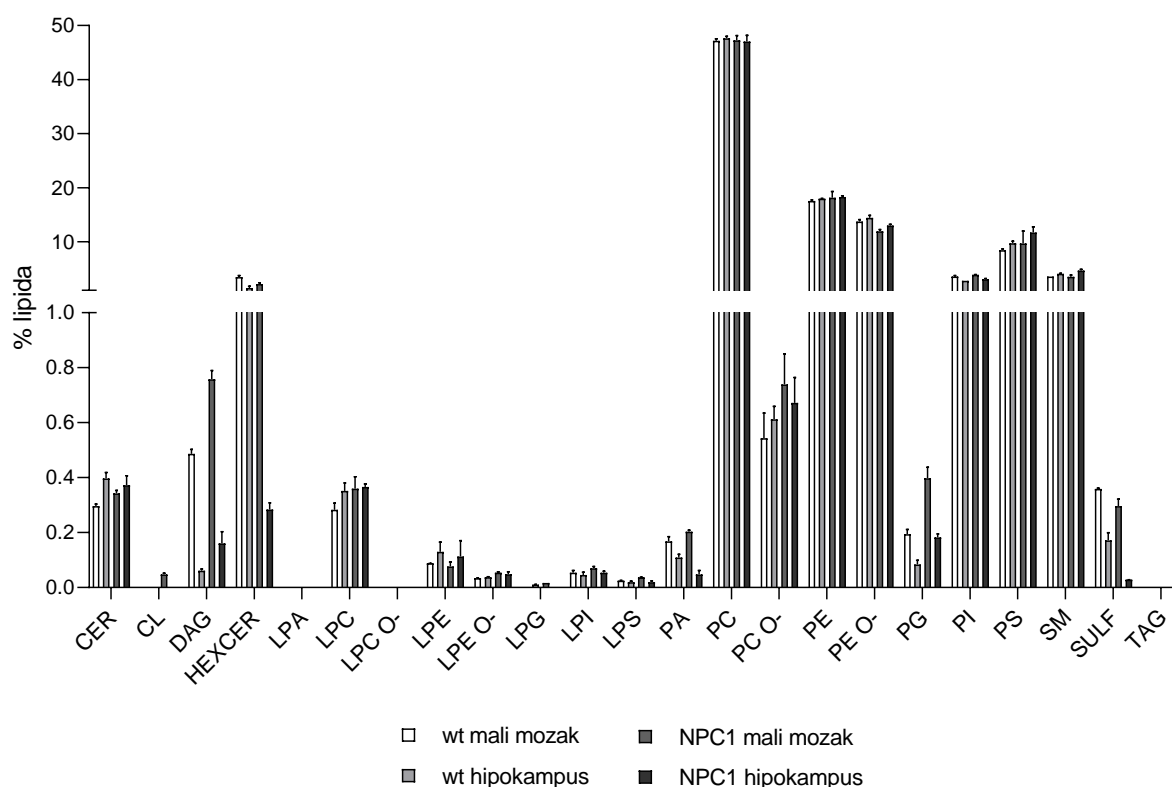
**4.6.2. Analiza lipida u frakcijama ranih endosoma malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt**

Analiza ukupne količine lipida pokazala je da frakcija ranih endosoma malog mozga miševa NPC1 ima veću ukupnu količinu lipida u odnosu na wt. Za razliku od miševa wt gdje je ukupna količina lipida u frakciji ranih endosoma podjednaka između malog mozga i hipokampusa, u miševima NPC1 ukupna količina lipida u frakciji ranih endosoma hipokampusa je manja u odnosu na mali mozak, no razlika nije pokazala statističku značajnost (Slika 30).



**Slika 30. Ukupna količina lipida u frakciji ranih endosoma malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa wt i NPC1.** Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dva biološka replikata  $\pm$  SD. Dobivene vrijednosti analizirane su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom i nisu uočene statistički značajne razlike.

Analiza lipidog sastava frakcija ranih endosoma pokazala je da su PC, PE, PE O-, PS, PI, SM, HexCer najviše zastupljeni lipidi (iznad 1%) u frakcijama ranih endosoma malog mozga i hipokampusa miševa wt i NPC1 (Slika 31.).



**Slika 31. Lipidni sastav frakcija ranih endosoma malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt.** Količina pojedinog lipidnog razreda je normalizirana na ukupnu količinu lipida u pripadajućem uzorku i izražena je kao postotak lipida u uzorku. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dva biološka replikata  $\pm$  SD.

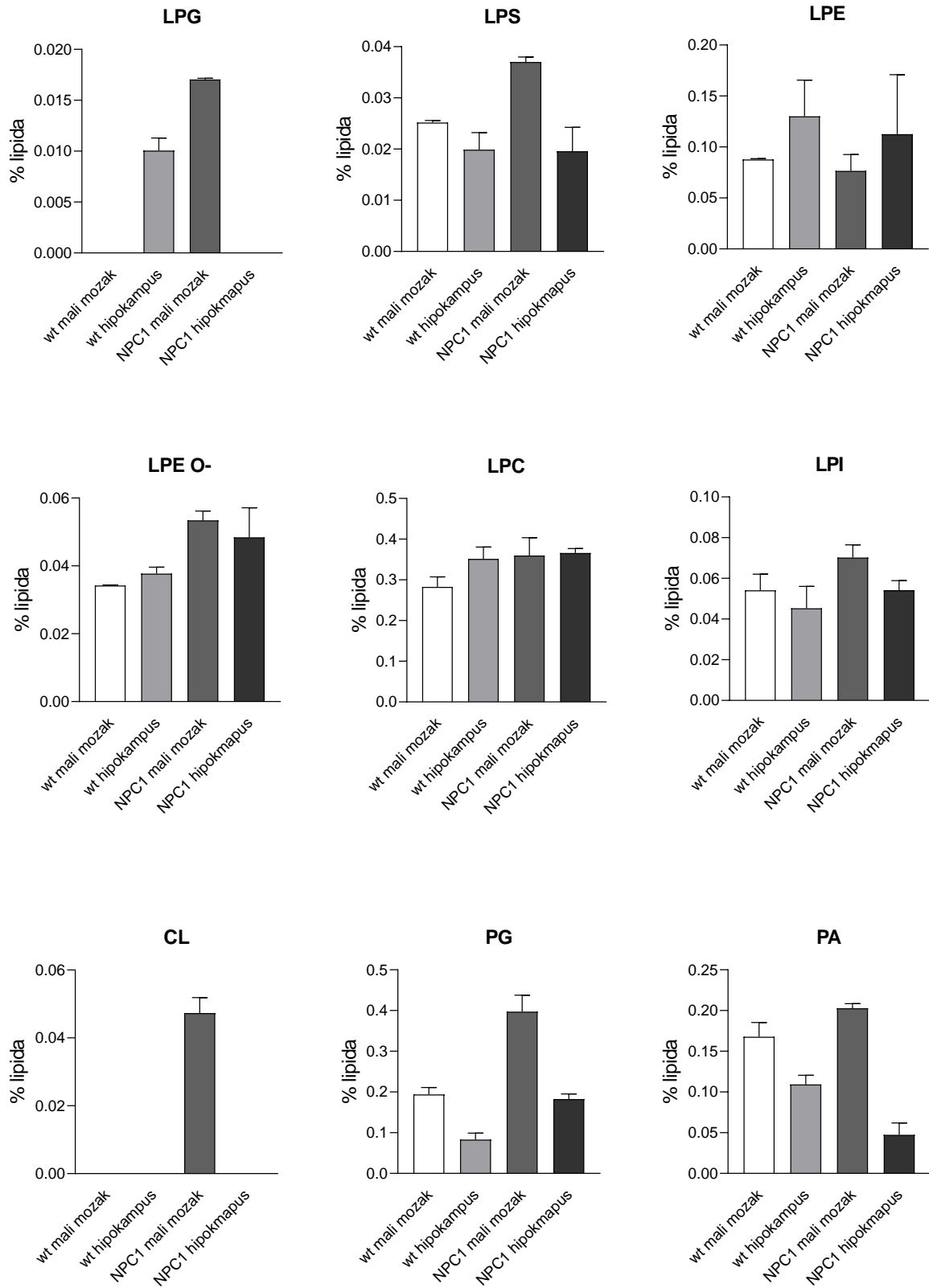
U frakcijama ranih endosoma fosfolipid LPG je pokazao različitu raspodjelu između malog mozga i hipokampusa u miševima wt i NPC1. U miševima NPC1 LPG je utvrđen u malom mozgu dok je u miševima wt utvrđen samo u hipokampusu. Iako je veća količina fosfolipida LPS utvrđena u frakciji ranih endosoma malog mozga miševa NPC1 u odnosu na hipokampus, nije pokazana statistička značajnost. U malom mozgu i hipokampusu miševa NPC1 utvrđena je veća količina fosfolipida LPE O- u odnosu na wt, ali ova razlika nije bila statistički značajna. Također, za fosfolipide LPE, LPC i LPI nisu uočene značajne razlike u frakcijama ranih endosoma u istim moždanim regija između miševa NPC1 i wt, niti unutar istog genotipa između frakcija ranih endosoma (Slika 32. A).

Nadalje fosfolipidi CL je utvrđen samo u frakciji ranih endosoma malog mozga miševa NPC1. Iako nije pokazana statistička značajnost u frakciji ranih endosoma malog mozga miševa NPC1 uočena je veća količina fosfolipida PG u odnosu na wt. Također, u oba genotipa utvrđena je veća količina PG-a u frakcijama malog mozga u odnosu na hipokampus, ali te razlike nisu statistički značajne. Još jedan fosfolipid za koji su utvrđene razlike je PA. U miševima NPC1 u frakciji ranih endosoma hipokampusa uočena je smanjena količina PA u odnosu na mali mozak premda ta razlika nije pokazala statističku značajnost. Za lipide PC, PC O-, PE, PE O-, PI, PS nisu uočene značajne razlike između ispitanih uzoraka (Slika 32. A).

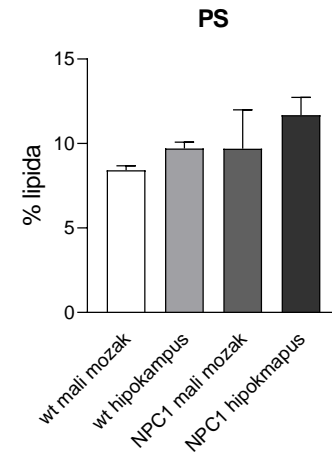
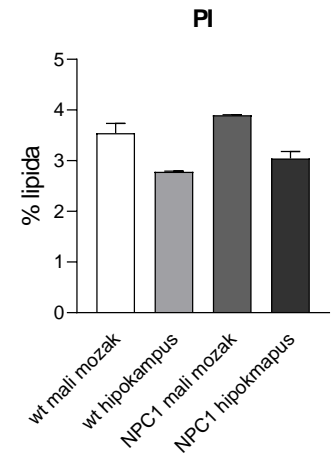
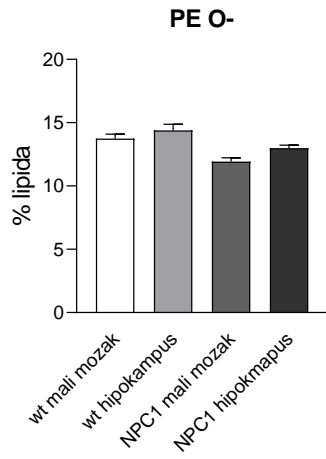
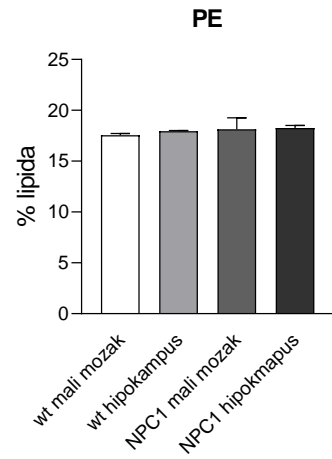
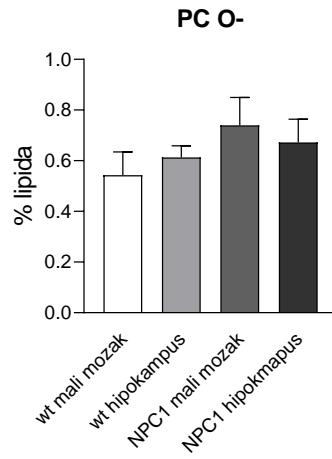
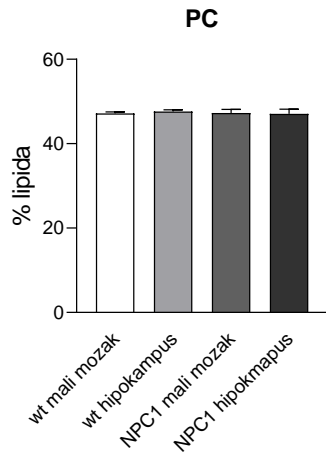
U frakcijama ranih endosoma malog mozga miševa NPC1 i wt utvrđene su veće količine glicerolipida DAG u odnosu na hipokampus ali razlike nisu bile statistički značajne. Također, iako nije utvrđena statistička značajnost, u miševima NPC1 u frakcijama ranih endosoma u malom mozgu utvrđena je veća količina DAG u odnosu na wt (Slika 32. B).

Za sfingolipide Cer i SM nisu uočene značajne razlike između analiziranih uzoraka. U frakcijama ranih endosoma malog mozga i hipokampusa miševa wt utvrđena je veća količina sfingolipida HexCer u odnosu na NPC1, premda razlike nisu bile statistički značajne. Također, u frakcijama ranih endosoma između hipokampusa i malog mozga miševa NPC1 utvrđena je znatno manja količina HexCer u hipokampusu u odnosu na mali mozak, ali ta razlika nije pokazala statističku značajnost. Slično je uočeno i za sfingolipid Sulf u mozgu miševa NPC1 gdje je u frakcijama ranih endosoma njegova količina u hipokampusu znatno manja u odnosu na mali mozak, ali bez statističke značajnosti (Slika 32. C). Najznačajnije promjene u frakcijama ranih endosoma malog mozga miševa NPC1 u odnosu na wt su detektirane u raspodjeli lipida kardiolipina i LPG koji se značajno razlikovao i u frakcijama ranih endosoma hipokampusa NPC1 u odnosu na wt miševa. Također, najznačajnije promjene u raspodjeli i razini lipida između moždanih regija malog mozga i hipokampusa miševa NPC1 su utvrđene također za lipide kardiolipin i LPG.

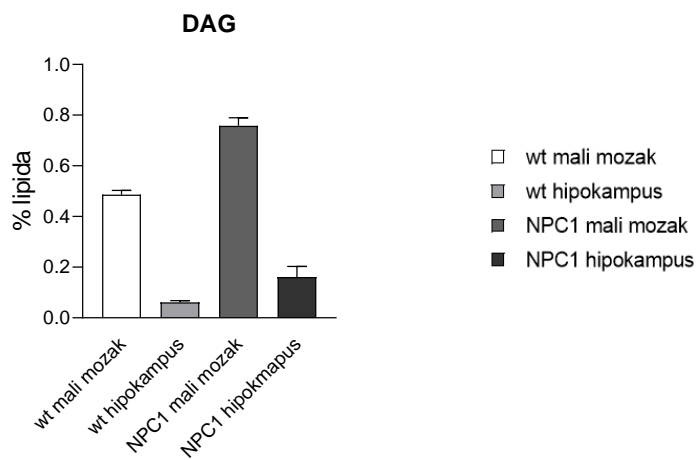
A)



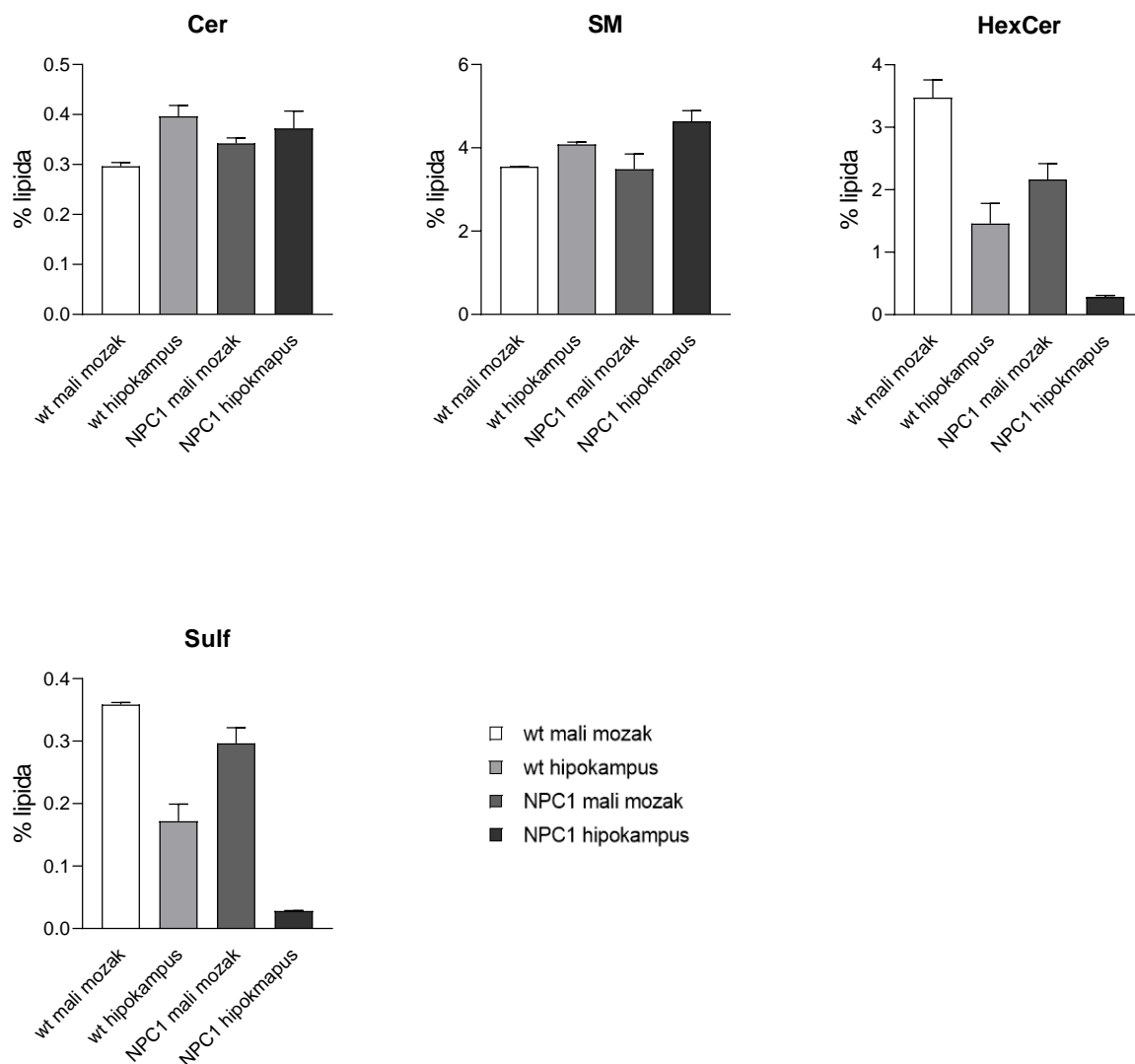




**B)**



C)



**Slika 32. Analiza lipidnih razreda u frakcijama ranih endosoma malog mozga i hipokampusu 4 tjedna starih miševa wt i NPC1.** Analizirani lipidni razredi su prikazani po kategorijama A) fosfolipidi, B) glicerolipidi, C) sfingolipidi. Lipidni razred je naveden iznad svakog grafa. Količina pojedinog lipidnog razreda je normalizirana prema ukupnoj količini lipida u pripadajućem uzorku i izražena je kao postotak lipida u uzorku. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dva biološka replikata  $\pm$  SD. Dobivene vrijednosti analizirane su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom i nisu uočene statistički značajne razlike.

## 5. RASPRAVA

BACE1 je ključan enzim u patogenezi Alzheimerove bolesti (AB) jer katalizira prvi korak u amiloidogenoj proteolitičkoj razgradnji proteina APP što rezultira stvaranjem toksičnog peptida A $\beta$  za koji se smatra da pokreće kaskadu patoloških događaja u AB. Zbog toga je ova proteaza postala glavna meta u razvoju terapije za AB (Vassar i sur., 1999; Cole i Vassar 2007; Vassar, 2014; Yan, 2017). No klinička ispitivanja inhibitora proteaze BACE1 su zaustavljena zbog pojave neželjenih nuspojava koje su najvjerojatnije posljedica djelovanja inhibitora na cijepanje drugih fizioloških supstrata proteaze BACE1. Nedavno otkriće velikog broja novih supstrata proteaze BACE1 ukazalo je na njenu značajnu ulogu u mozgu (Kuhn i sur., 2012). Stoga je razumijevanje mehanizma djelovanja proteaze BACE1 kao i uloge proteolize različitih supstrata ove proteaze važno kako bi se što bolje procijenio terapijski potencijal BACE1. S tim u skladu cilj ovog doktorata je bio razjasniti (dis)funkciju proteaze BACE1 u rijetkoj neurodegenerativnoj bolesti Niemann-Pick tipa C (NPC).

Zanimljivo je da rijetka nasljedna monogenska bolest NPC pokazuje niz sličnosti s kompleksnom AB, čija je etiologija složena i uključuje genetičke i okolišne čimbenike, što ukazuje da bi ove dvije bolesti mogle dijeliti iste molekularne mehanizme neurodegeneracije i/ili neuroinflamacije. Naime, naša prethodna istraživanja su ukazala na povećano cijepanje proteazom BACE1 supstrata APP u NPC1-null stanicama (Malnar i sur., 2009), kao i drugih BACE1 supstrata, Sez6 i Sez6L, u mozgovima miševa NPC1 (Čaušević i sur., 2018). Nadalje, pokazali smo da je povećano cijepanje proteazom BACE1 vrlo vjerojatno posljedica nakupljanja proteina APP, te drugih BACE1 supstrata Sez6 i Sez6L, i proteaze BACE1 u endosomima (Malnar i sur., 2012), uslijed disfunkcije retromernog transporta u bolesti NPC (Dominko i sur., 2021). Osim toga, istraživanja drugih grupa opisala su povećane razine peptida A $\beta$  u bolesti NPC (Yamazaki i sur., 2001; Burns i sur., 2003). S obzirom na sličnosti AB i bolesti NPC te prethodna istraživanja specifični ciljevi ovog rada su bili istražiti ulogu proteaze BACE1 u bolesti NPC i ispitati može li inhibicija njenog djelovanja ublažiti patološke karakteristike ove bolesti. Također, s obzirom na karakteristično nakupljanje i narušenu homeostazu lipida u bolesti NPC, analiziran je sastav lipidoma u moždanim regijama miševa NPC1 i wt te u frakcijama endosoma s ciljem otkrivanja potencijalnih lipida odgovornih za različitu vulnerabilnost moždanih regija hipokampusa i malog mozga u bolesti NPC kao i za disfunkciju endosoma.

## **5.1. Povećana proteoliza supstrata BACE1- Sez6, Sez6L i njihov promijenjeni smještaj u neuronima NPC1**

Proteini Sez6 i Sez6L se isključivo cijepaju protezom BACE1 u mozgu (Kuhn i sur., 2012; Yan i Vassar, 2014) U ovom radu je po prvi put pokazana povećana proteoliza proteina Sez6L i Sez6 proteazom BACE1 u primarnim kulturama kortikalnih neurona izoliranim iz mozga miševa NPC1 u odnosu na wt. Dobiveni rezultati u primarnim kulturama neurona su u skladu s našim prethodnim istraživanjem gdje je u mozgu miševa NPC1, već u asimptomatskoj fazi bolesti u 4 tjedna starih miševa utvrđeno povećano cijepanje proteina Sez6L i Sez6 proteazom BACE1 (Čaušević i sur., 2018). Ovi rezultati ukazuju da bi povećano cijepanje protezom BACE1 u neuronima moglo predstavljati jedan od ranih patološki događaja u bolesti NPC te da bi povećana proteoliza supstrata Sez6L i Sez6 mogla imati ulogu u patogenezi ove bolesti. Doista, Sez6L i Sez6 imaju ulogu u razvoju sinapsi i njihovoj funkciji (Osaki i sur., 2011), a Gunnarsen i suradnici (2007) su pokazali da izlučeni N-terminalni odsječak i nepocijepani oblik proteina Sez6 imaju suprotne učinke na grananje neurita, gdje izlučeni N-terminalni odsječak povećava broj neurita i samim time utječe na sinaptičku povezanost, koja je narušena u bolesti NPC. Također, povišene razine N-terminalnih odsječaka proteina Sez6L i Sez6 su utvrđene u likvoru pacijenata s bipolarnim poremećajem, shizofrenijom, teškom depresijom (Maccarrone i sur., 2013) što su neki od psihijatrijskih poremećaja koji se javljaju u bolesti NPC (Bonnot i sur., 2019). Stoga bi povećana proteoliza i samim time narušena ravnoteža između razine nepocijepanih proteina Sez6L i Sez6 i izlučenih odsječaka sSez6 i sSez6L mogla doprinijeti patološkim promjenama u bolesti NPC. Za većinu supstrata BACE1, pa tako i za proteine Sez6L i Sez6, još uvijek nije poznato koje su biološke funkcije odsječaka nastalih cijepanjem proteazom BACE1 (N- i C-terminalni odsječci) kao i cjelovitih nepocijepanih oblika proteina. Stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se istražila uloga proteaze BACE1 i njenih supstrata u zdravlju i u bolesti.

Za razliku od proteina Sez6L i Sez6, protein APP se osim proteazom BACE1 u stanici cijepa i proteazom ADAM 10 (Haass i sur., 2012). Naše prethodno istraživanje je pokazalo značajno povećanu proteolizu proteina APP u mozgovima miševa NPC1 (Čaušević i sur., 2018). Iako u primarnim kulturama neurona NPC1 razina ukupnih izlučenih N-terminalnih odsječaka APP (sAPP $\alpha$  + sAPP $\beta$ ) nije bila statistički značajno povećana u odnosu na wt, rezultati ovog rada su pokazali značajno povećano cijepanje isključivih supstrata BACE1- Sez6L i Sez6 što upućuje da je proteoliza proteazom BACE1 povećana. Također, u primarnim

kortikalnim neuronima miševa NPC1 detektirana je povišena razina proteina BACE1 što može biti posljedica njegovog nakupljanja uslijed otežane razgradnje u lizosomima i/ili njegovog povećanog stvaranja. Sumarno, pokazali smo da nedostatak proteina NPC1 u primarnim kulturama neurona dovodi do povećane razine BACE1 i posljedično, pretpostavljamo, do njegove povećane aktivnosti i povećanog cijepanja BACE1 supstrata, kao npr. Sez6 i Sez6L. Utvrđeno nakupljanje BACE1 u mišjim primarnim kulturama neurona NPC1 u skladu je s rezultatima u mišjem modelu bolesti NPC (Kodam i sur., 2010). Osim toga, značajno povećana razina i aktivnost proteaze BACE1 opisana je i u mišjim modelima AB, kao i u mozgu pacijenata s AB (Fukumoto i sur., 2002; Chow i sur., 2010; Kandalepas i sur., 2013), ukazujući da bi, uz prethodno uočene sličnosti, disfunkcija BACE1 mogla predstavljati dodatnu zajedničku karakteristiku NPC i AB.

Prethodna istraživanja na staničnom modelu bolesti NPC su pokazala da dolazi do promijenjenog transporta i smještaja proteina APP i BACE1 u ranim i reciklirajućim endosomima što vjerojatno dovodi do povećanog cijepanja proteina APP proteazom BACE1 (Malnar i sur., 2010; Malnar i sur., 2012). U skladu s tim istraživanjem, u ovom radu rezultati imunocitokemijske analize primarnih hipokampalnih neurona izoliranih iz miševa NPC1 su pokazali promijenjen smještaj supstrata Sez6, a posebice Sez6L, u neuritima unutar ranih endosoma što ukazuje da se proteoliza ovih supstrata najvjerojatnije odvija u ranim endosomima koji imaju optimalan pH za aktivnost proteaze BACE1 (Vassar i sur., 1999; Cole i Vassar 2007; Kandalepas i Vassar, 2012; Sathya i sur., 2012). Stoga, pretpostavljamo da bi uočena povećana proteoliza supstrata Sez6L i Sez6 u neuronima NPC1 mogla biti posljedica njihovog promijenjenog transporta i povećanog nakupljanja u ranim endosomima. Također imunocitokemijska analiza je pokazala da je u primarnim neuronima NPC1 protein Sez6L dao više točkastije obojenje i to posebice u izdancima neurona gdje su uočene veće nakupine, dok je Sez6 pokazao signal u manjim nakupinama u somi i izdancima neurona. Iako se hipokampus smatra relativno zaštićenim i najmanje „pogođenim“ u bolesti NPC, ovim rezultatima smo pokazali prisutnost patoloških promjena i u hipokampalnim neuronima NPC1, uključujući nakupljanje kolesterola, poremećaj endolizosomalnog puta i poremećaj transporta supstrata BACE1 te povećano cijepanje ovih supstrata proteazom BACE1.

## 5.2. Inhibicija proteaze BACE1 u primarnim kulturama neurona i u kulturi organotipskih rezova mozgov miševa NPC1

Nakon što je pokazano povećano cijepanje proteazom BACE1 u primarnim kulturama neurona, sljedeći cilj je bio ispitati ulogu te molekularni mehanizam povećanog djelovanja proteaze BACE1 u neuronima, tj. u bolesti NPC. Stoga je u ovom radu po prvi put ispitan utjecaj inhibicije enzima BACE1 na proteolizu i smještaj supstrata BACE1 te na patološka obilježja bolesti NPC.

U primarnim kulturama kortikalnih neurona inhibicija proteaze BACE1 (inhibitor C3) dovela je do nakupljanja nepocijepanih oblika proteina Sez6L (flSez6L) i Sez6 (flSez6) u staničnim lizatima dok u mediju u kojem su neuroni uzgajani nisu utvrđeni N-terminalni odsječci (sSez6L, sSez6). Ovi rezultati su potvrdili uspješnu inhibiciju proteolitičke aktivnosti enzima BACE1 u primarnim kulturama neurona. Za razliku od proteina Sez6L i Sez6 u mediju tretiranih neurona su utvrđeni N-terminalni odsječci proteina APP jer se, za razliku od proteina Sez6 i Sez6L, APP cijepa i drugim sekretazama, npr.  $\alpha$ -sekretazom. Nažalost, N-terminalno antitijelo koje specifično veže samo odsječak sAPP $\beta$ , koji je izravan produkt cijepanja proteina APP proteazom BACE1 (Haass i sur., 2012; Zhang i sur., 2020), nije dalo zadovoljavajuće rezultate te stoga nismo bili u mogućnosti pratiti BACE1 inhibiciju proteina APP, već je korišteno antitijelo koje se veže za ukupne N-terminalne odsječke proteina APP (sAPP $\alpha$  + sAPP $\beta$ ). Stoga su ispitane endogene razine C-terminalnih membranskih odsječaka proteina APP (CTF $\beta$  i CTF $\alpha$ ). Naime u različitim *in vitro* i *in vivo* modelima bolesti NPC, kao i u fibroblastima NPC pacijenata pokazano je povećano nakupljanje odsječaka CTF $\beta$ , što potvrđuje povećanu proteolizu proteina APP enzimom BACE1 (Burns i sur., 2003; Jin i sur., 2004; Kodam i sur., 2010; Cariat i sur., 2021). Sukladno s tim istraživanjima, u primarnim kortikalnim neuronima NPC1 detektirane su povećane razine odsječaka CTF $\beta$ . Tretman inhibitorom BACE1 je uzrokovao značajno povećanje razine odsječaka CTF $\alpha$  u tretiranim neuronima NPC1, čime je potvrđena uspješna inhibicija cijepanja supstrata APP proteazom BACE1 u neuronima NPC1 te aktivacija neamiloidogenog puta razgradnje proteina APP  $\alpha$ -sekretazom. Ove analize su pokazale uspješnu inhibiciju proteaze BACE1 u primarnim kulturama neurona miševa NPC1.

Nadalje, u ovom radu smo pokazali da inhibicija proteaze BACE1 u primarnim hipokampalnim neuronima miševa NPC1 utječe na smještaj supstrata Sez6L i Sez6. Tretman inhibitorom BACE1 smanjio je nakupljanje proteina Sez6L i Sez6 u ranim endosomima NPC1

neurona u odnosu na netretirane neurone. Naime, u tretiranim neuronima NPC1 uočen je manji broj nakupina proteina Sez6L te smanjeni signal i smanjenje nakupina proteina Sez6 u odnosu na netretirane neurone NPC1. U somi tretiranih neurona obojenje Sez6L i Sez6 je dalo difuzan signal, tj. sličniji signalu kakav je uočen u neuronima wt. Sumarno, ovi rezultati pokazali su da inhibicija proteaze BACE1 djelomično popravlja promijenjeni transport supstrata BACE1-Sez6L i Sez6 u mišjim primarnim hipokampalnim neuronima NPC1.

Budući da je disfunkcija endolizosomalnog puta jedno od patoloških obilježja bolesti NPC (Nixon, 2005), te ujedno i najranija patološka karakteristika AB (Nixon i sur., 2001) praćen je učinak inhibicije proteaze BACE1 na smještaj i razinu proteina vezikula endolizosomalnog puta: ranih endosoma (biljeg EEA1) i lizosoma (biljeg LAMP1). Poznato je da je značajno povećanje vezikula ranih endosoma jedan od ranih patoloških događaja u AB, koje dovodi do endosomalne disfunkcije te posljedično povećane ranjivost neurona (Cataldo i sur., 2004; Jiang i sur., 2010). Također povećani rani endosomi su utvrđeni i u Purkinjeovim neuronima u bolesti NPC (Jin i sur., 2004). U skladu s time, u ovom radu je pokazano da hipokampalni neuroni u somi i neuritima imaju povećane endosome što ukazuje na disfunkciju ranih endosoma i u neuronima hipokampusu, regiji mozga koja pokazuje najmanju patologiju u bolesti NPC. Inhibicija proteaze BACE1 u neuronima NPC1 rezultirala je smanjenjem veličine ranih endosoma posebice u neuritima tretiranih neurona NPC1. Naime prijašnja istraživanja su pokazala da je nakupljanje odsječaka CTF $\beta$  odgovorno za povećanje ranih endosoma i njihovu disfunkciju u AB (Jiang i sur., 2010; Kim i sur., 2016; Lauritzen i sur., 2016; Nixon, 2017). Doista, Jiang i suradnici (2010) su pokazali da smanjena ekspresija BACE1 u fibroblastima osoba s Downovim sindromom, smanjuje stvaranje odsječaka CTF $\beta$  i dovodi do značajnog smanjenja veličine ranih endosoma. Rezultati ovog pokusa pokazali su da primarni hipokampalni neuroni miševa NPC1 imaju povećane rane endosome ukazujući na njihovu disfunkciju te da tretman inhibitorom proteaze BACE1 djelomično popravljaju njihovu morfologiju i smještaj. Djelomičan popravak veličine i lokalizacije organela ranih endosoma uslijed inhibicije BACE1 vjerojatno je posljedica smanjene razine odsječaka CTF $\beta$  te činjenice što je disfunkcija endolizosomalnog puta u neuronima NPC1 prvenstveno uzrokovana nakupljanjem kolesterola u kasnim endosomima/lizosoma uslijed nedostatka proteina NPC1 koje predstavlja primarnu patološku karakteristiku bolesti NPC. Opažanje da inhibicija BACE1 u primarnoj kulturi hipokampalnih neurona nije imala nikakav učinak na promijenjenu morfologiju lizosoma, ide u prilog ovom zaključku.

Nadalje, uočena promijenjena morfologija organela endolizosomalnog puta nije bila popraćena promjenama u razini proteina EEA1 (biljeg ranih endosoma) i LAMP1 (biljeg kasnih endosoma), niti je inhibicija proteaze BACE1 imala utjecaja na njihovu razinu što pokazuje da promijenjena morfologija i smještaj organela endolizosomalnog puta, a ne njihova razina, pridonosi patološkim promjenama u bolesti NPC.

U bolesti NPC dolazi do izražene patologije proteina tau. U većini juvenilnih i odraslih pacijenata s NPC prisutni su neurofibrilarni snopići koji su strukturno i imunološki slični onima u AB ukazujući da su patološke promjene proteina tau u ova dva poremećaja uzrokovana istim mehanizmom (Auer i sur., 1995; Distl i sur., 2003). Iako imunocitokemijska analiza u primarnim hipokampalnim neuronima nije pokazala razlike u bojanju fosforiliranog tau (PHF1) i ukupnog tau (total tau) između neurona NPC1 i wt, analiza Western blot je utvrdila značajno povećanu razinu ukupnog tau proteina u lizatima primarnih kortikalnih neurona NPC1 u odnosu na neurone wt. Također, razina PHF1 proteina povišena je u kortikalnim neuronima NPC1 u odnosu na wt. Ovim rezultatima potvrđena je prisutnost tau patologije u kulturi kortikalnih neurona NPC1 što je u skladu s prijašnjim rezultatima koja su pokazala povišene razine hiperfosforiliranog i ukupnog proteina tau u mozgovima pacijenata s bolesti NPC i miševa NPC1 (Bu i sur., 2002; Mattsson i sur., 2011). Brojna istraživanja su pokazala da topivi oligomeri peptida A $\beta$  neizravno utječu na propagaciju tau patologije (Zheng i sur., 2002; Lloret i sur., 2015; Kametani i Hasegawa, 2018; Long i Holtzman, 2019). Međutim mehanizmi koji povezuju A $\beta$  i hiperfosforilaciju proteina tau još uvijek nisu razjašnjeni i predmet su brojnih rasprava i istraživanja. Dosadašnji rezultati istraživanja utjecaja inhibicije BACE1 na tau patologiju su oprečni. Dok u nekim istraživanjima nije uočen utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na razine hiperfosforiliranog i ukupnog proteina tau (Timmers i sur, 2018; Das i Yan, 2019), u drugima je pokazano da inhibicije proteaze BACE1 značajno smanjuje razinu fosforiliranog i ukupnog proteina tau (Israel i sur., 2012; Schelle i sur., 2017; Neumann i sur., 2018). U skladu s tim rezultatima, u ovom radu pokazano je da inhibicija proteaze BACE1 u primarnim kortikalnim neuronima NPC1 značajno snižava razinu ukupnog proteina tau u odnosu na netretirane neurone što pokazuje potencijalan doprinos proteaze BACE1 razvoju tau patologije u bolesti NPC.

Neuroinflamacija je zajedničko obilježje neurodegenerativnih bolesti i smatra se da kronična aktivacija stanica imunološkog sustava (astrocita i mikroglia) u mozgu doprinosi progresiji ovih bolesti (Cougnoux i sur., 2018; Roda i sur., 2022). Međutim, još uvijek nije razjašnjeno je li neuroinflamacija posljedica neurodegeneracije i/ili se javlja neovisno i



paralelno uz neurodegeneraciju. Zanimljivo je da se u bolesti NPC neuroinflamacija javlja prije pojave drugih patoloških značajki i prvih simptoma (Cologna i sur., 2014; Platt i sur., 2016). Baudry i suradnici (2003) su pokazali da je prvi dokaz neuroinflamacije kod miševa NPC1 aktivacija mikroglia koja potiče kaskadu i posljedično aktivaciju astrocita. Za ispitivanje utjecaja inhibicije enzima BACE1 na neuroinflamaciju tj. aktivaciju stanica mikroglia (biljeg CD68) i astrocita (biljeg GFAP), uspostavljen je *ex vivo* model bolesti NPC- kultura organotipskih rezova mozga koja vjerno oponaša složenost moždanog tkiva i interakciju različitih stanica u mozgu (Croft i sur., 2019) za razliku od primarnih kultura moždanih stanica. U kulturi mišjih kortiko-hipokampalnih rezova NPC1 broj aktivnih mikroglia je bio značajno veći u odnosu na wt uzorke, što potvrđuje da ovaj *ex vivo* model vjerno rekapitulira neuroinflamaciju u bolesti NPC. No, nije uočena jasna razlika u aktivaciji astrocita (GFAP) između kultura kortiko-hipokampalnih rezova miševa NPC1 i wt. Naime, paralelno uz aktivaciju astrocita u ovom *ex vivo* modelu NPC1, aktivacija astrocita je uočena i u kulturi wt miševa, što je vjerojatno posljedica manipulacije, odnosno rezanja/ozljede moždanog tkiva tijekom uspostave organotipskih kultura ili neke druge promjene koju nismo mogli kontrolirati, a koja je narušila homeostazu astrocita (Sofroniew i Vinters, 2010; Colombo i Farina, 2016). Međutim, tretman inhibitorom proteaze BACE1 smanjio je aktivaciju astrocita i aktivaciju mikroglia u kulturi kortiko-hipokampalnih rezova miševa NPC1 u kojoj je detektiran smanjen signal i manji broj stanica pozitivnih na CD68, kao i smanjen signal GFAP. Također, Neumann i suradnici (2015) su pokazali da je tretman s inhibitorom BACE1 (NB360) značajno smanjio broj aktiviranih mikroglia i GFAP pozitivnih nakupina astrocita u transgeničnom mišjem modelu AB. Još uvijek nisu razjašnjeni mehanizmi koji pokreću upalu u bolesti NPC kao i u drugim lizosomskim bolestima nakupljanja (Platt i sur., 2016), no istraživanje u AB modelima su ukazala na značajan utjecaj ne samo oligomera A $\beta$  već i odsječaka CTF $\beta$  na aktivaciju imunološkog sustava u mozgu (Lauritzen i sur., 2016; Bachiller i sur., 2018). Također, Rotamin i suradnici (2019) su utvrdili povećane razine proteina Sez6 u likvoru pacijenata koji imaju kroničnu upalnu bol. Budući da je pokazan povoljan učinak inhibicije proteaze BACE1 na smanjenje aktivacije stanica imunološkog sustava u mozgu, pretpostavljamo da odsječci nastali cijepanjem supstrata BACE1 u bolesti NPC mogu doprinijeti aktivaciji astrocita i mikroglia, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se to potvrdilo.

### **5.3. Raspodjela supstrata BACE1 u endolizosomskim frakcijama moždanih regija miševa NPC1 i wt**

U ovom doktorskom radu pokazan je promijenjen transport supstrata enzima BACE1 i njihovo nakupljanje u vezikulama ranih endosoma u neuritima neurona NPC1. Kako bismo ispitali je li uočeni poremećaj prisutan i u moždanom tkivu, iz malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt izdvojene su frakcije endolizosoma te je analizirana raspodjela i razina biljega endolizosomalnog puta kao i supstrata Sez6, Sez6L, APP te proteaze BACE1 u ove dvije regije. Ujedno, analiza asimptomatskih 4 tjedana starih moždanih regija (Platt 2016) imala je za cilj utvrditi najranije promjene u endolizosomalnom transportu i u raspodjeli enzima i supstrata BACE1 u mozgovima miševa NPC1 u odnosu na miševe wt. Nadalje, s obzirom da je u bolesti NPC primarno pogođen mali mozak (Purkinjeovi neuroni), a hipokampus se smatra relativno očuvanim (German i sur., 2001), analizom ovih regija željeli smo utvrditi potencijalnu ulogu utvrđenih promjena na njihovu različitu vulnerabilnost u bolesti NPC. U tu svrhu uspostavljena je metoda frakcioniranja endolizosomalnih vezikula iz tkiva malog mozga i hipokampusa ultracentrifugiranjem u diskontinuiranom gradijentu saharoze gdje su vezikule razdvojene na temelju svoje gustoće koja ovisi o omjeru sadržaja proteina i lipida u volumenu vezikula. Endolizosomalni put je izrazito dinamičan gdje neprestano dolazi do sazrijevanja vezikula i njihove interakcije, stoga nije moguće dobiti u potpunosti čiste frakcije izdvojenih lizosoma i kasnih, odnosno ranih endosoma (de Araújo i sur., 2015). Ipak uspješno su razdvojene vezikule lizosoma (LAMP1) od vezikula ranih endosoma (EEA1), dok su se vezikule kasnih endosoma (Rab7) uglavnom preklapale prvenstveno sa ranim endosomima (bijegom EEA1).

U malom mozgu nije uočena razlika u raspodjeli LAMP1 (biljega lizosoma) između miševa NPC1 i wt, dok su Rab7 (biljeg kasnih endosoma) i EEA1 (biljeg ranih endosoma) pokazali različitu raspodjelu u malom mozgu miševa NPC1 u odnosu na wt. Za razliku od wt miševa u malom mozgu miševa NPC1 Rab7 je utvrđen i u lakšim frakcijama što je vjerojatno posljedica nakupljanja slobodnog kolesterola i drugih lipida u ovim vezikulama uslijed nedostatka proteina NPC1 (Vanier, 2010). Zanimljivo je da je uočena razlika u raspodjeli i razini biljega ranih endosoma između uzoraka malog mozga NPC1 u odnosu na wt. Utvrđena promijenjena raspodjela ispitanih endolizosomalnih vezikula u malom mozgu 4 tjedna starih miševa NPC1 ukazuje na poremećaj u njihovom transportu i biogenezi već u asimptomatskoj fazi bolesti. Poremećaj u biogenezi ranih endosoma dovodi do promijenjene morfologije, tj. do

povećanja promjera vezikula endosoma (Kaur, 2018) što je u skladu s dobivenim rezultatima u primarnim kulturama neurona NPC1 gdje su uočene nakupine ovih organela u neuritima. Nadalje u malom mozgu utvrđena je različita raspodjela supstrata BACE1 (Sez6, APP, Sez6L). Njihova raspodjela je pratila raspodjelu EEA1, što ukazuje na različit transport supstrata BACE1 u endolizosomalnom putu i nakupljanje u ranim endosomima u malom mozgu NPC1 u odnosu na wt miševе. Zanimljivo, protein Sez6L je pokazao najjasniju razliku u raspodjeli u malom mozgu između miševa NPC1 i wt već u najranijoj fazi bolesti. Njegova raspodjela u malom mozgu 4 tjedna starih miševa pokazuje sličnost s promijenjenom raspodjelom u malom mozgu 10 tjedana starih miševa NPC1 (terminalna faza bolesti) gdje je uočeno znatno nakupljanje Sez6L u EEA1 pozitivnim vezikulama, što u konačnici vjerojatno rezultira njegovim povećanim cijepanjem proteazom BACE1 (Čaušević i sur., 2018; Dominko i sur., 2021).

Za razliku od malog mozga i kulture primarnih hipokampalnih neurona, u hipokampusu 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt nije uočena razlika u raspodjeli EEA1, dok je utvrđena različita raspodjela kasnih endosoma i lizosoma. Pretpostavljamo da uočeni izostanak poremećaja ranih endocitnih vezikula u moždanom tkivu hipokampusa miševa NPC1 može imati povoljan utjecaj na kasniji početak patoloških promjena u ovoj regiji mozga koja se smatra najmanje pogođenom u bolesti NPC (Platt i sur., 2016). Također, uz iznimku za protein Sez6L, nije uočena razlika ni u raspodjeli proteina Sez6, APP i enzima BACE1. Budući da je protein Sez6L pokazao jasno promijenjenu raspodjelu u malom mozgu i u hipokampusu te značajno povišeno cijepanje proteazom BACE1 već u 4 tjedna starih miševa NPC1 (Čaušević i sur., 2018), tj. već u pre-simptomatskom stadiju pretpostavljamo da disfunkcija Sez6L može doprinijeti patološkim procesima u bolesti NPC.

U bolesti NPC, zbog nedostatka proteina NPC1, dolazi do nakupljanja slobodnog kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima (Xie i sur., 2000; Vainer, 2003). U staničnom modelu bolesti NPC (CHO NPC1 *null*) i u mozgovima 10 tjedana starih miševa NPC1 pokazano je značajno nakupljanje slobodnog neesterificiranog kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima (Malnar i sur., 2010; Dominko i sur., 2021). Za razliku od 10 tjedana starih NPC1 miševa, u kasnim endosomima/lizosomima izdvojenim iz malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih NPC1 miševa, tj. u presimptomatskoj fazi bolesti razina slobodnog kolesterola je povišena, ali ne značajno u odnosu na wt. Ovaj nalaz ukazuje da ispitani uzorci 4 tjedna starih, iako asimptomatskih, NPC1 miševa zaista pokazuju početne patološke promjene

karakteristične za NPC bolest, uključujući nakupljanje slobodnog kolesterola u kasnim endosomima/lizosomima i disfunkciju endolizosomalnog transporta.

#### **5.4. Raspodjela i razina lipinih razreda u moždanim regijama i u njihovim endosomskim frakcijama 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt**

Brojna istraživanja ukazuju da promijenjeni metabolizam lipida igra važnu ulogu u etiologiji i/ili u progresiji neurodegenerativnih bolesti (Hammond i sur., 2019; (Krasnobaev i sur., 2022). U ovom radu po prvi put je analiziran lipidom/lipidni sastav malog mozga i hipokampusa, te frakcija ranih endosoma izoliranih iz ovih moždanih regija 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt. Analiza lipidoma je pokazala da ne postoje značajne razlike u ukupnoj količini lipida u malom mozgu i hipokampusu, niti u izdvojenim frakcijama ranih endosoma ovih moždanih regija između 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt. No, analizom lipidnih razreda pokazana je značajna promjena u razini glicerolipida: diacilglicerola (DAG) i triacilglicerola (TAG) u malom mozgu miševa NPC1 u odnosu na wt. Naime, razina DAG u malom mozgu miševa NPC1 bila je statistički značajno povećana u odnosu na hipokampus ovih miševa. Također, razina DAG u malom mozgu NPC1 miševa je bila povećana u odnosu na mali mozak miševa wt, iako ta razlika nije pokazala statističku značajnost. Metabolizam DAG-a povezan je s nizom sinaptičkih procesa koji uključuju regulaciju morfologije dendritičkih trnova, plastičnost te oslobađanje neurotransmitera (Kim i sur., 2010). Osim toga, povećane razine DAG-a su utvrđene u mišjim modelima bolesti AB i u mozgu oboljelih od AB (Chan i sur., 2012; Dey i sur., 2020; Akyol i sur., 2021). Naime, DAG je sekundarni glasnik u stanici i glavni je aktivator protein kinaze C (PKC) koja je uključena u regulaciju neurotransmisije i plastičnosti sinapsi (Callender i Newton, 2017; Kolczynskai sur., 2020). Povećana aktivacija signalnog puta PKC narušava normalan prijenos signala u stanici i funkcioniranje sinapsi (Narita i sur., 2001; Callender i Newton, 2017). Stoga bi značajno povećane razine DAG već u asimptomatskoj fazi bolesti u malom mozgu miševa NPC1, u odnosu na hipokampus, potencijalno mogle doprinijeti disfunkciji sinapsi te povećanoj vulnerabilnosti neurona malog mozga u odnosu na neurone hipokampusa u bolesti NPC.

Osim toga, DAG je važan prekursor u sintezi fosfolipida i triacilglicerola (TAG) (Kolczynska 2020) koji su jedino utvrđeni u malom mozgu miševa NPC1. TAG ima primarnu ulogu u skladištenju i prijenosu energije (Bernath i sur., 2020). Zanimljivo, kao i za DAG,

povećana razina TAG utvrđena je u *post mortem* mozgovima pacijenata s AB (Akyol i sur., 2021). Također, neke studije su pokazale da su razine TAG povezane s kognitivnim funkcijama i to kroz disfunkciju krvno moždane barijere ili neravnoteže amiloidnog metabolizma te da povećane razine TAG negativno utječu na pamćenje. No, istraživanja o povezanosti TAG i kognitivnih funkcija su bila oprečna, stoga još uvijek nije jasno utječe li i kako TAG na kognitivne sposobnosti i koju ulogu njegov promijenjeni metabolizam ima u mozgu (Henderson i sur., 2003; Power i sur., 2018; Dimache i sur., 2021).

Osim glicerolipida, utvrđene su promijene i za fosfolipide točnije lizofosfolipide: lizo-fosfatidat (LPA), lizo-fosfatidiletanolamin eter (LPE O-) te lizo-fosfatidilglicerol (LPG). Lizofosfolipidi su važna obitelj lipidnih signalnih molekula i međuprekursori su za druge lipide (Yung i sur., 2015; Tan i sur., 2020; Krasnobaev i sur., 2022). Njihove koncentracije u stanicama su vrlo niske, a i najmanje promijene narušavaju integritet membrane i uzrokuju lizu stanica (Tan i sur., 2020). Oksidacijski stres i upala imaju značajan utjecaj na staničnu razinu lizofosfolipida. Povećane razine lizofosfolipida su detektirane u neurodegenerativnim bolestima poput AB, Parkinsonove bolesti i amiotrofične lateralne skleroze (Krasnobaev i sur., 2022). U našoj sudiji lizofosfolipid LPA utvrđen je u hipokampusu miševa NPC1 i wt, dok je u malom mozgu prisutan samo kod miševa NPC1. LPA je vrlo aktivna signalna molekula koja utječe na brojne procese u mozgu, uključujući proliferaciju neuralnih progenitorskih stanica (Yung i sur., 2011), mijelinizaciju (Weiner i Chun, 1999; Anliker i sur., 2013), sinaptički prijenos (Trimbuch i sur., 2009) i imunološki odgovor u mozgu (Möller i sur., 2001; Schilling i sur., 2004). Stoga promjene razine LPA mogu narušiti brojne važne procese u mozgu. Pokazano je da uslijed ozljede mozga dolazi do značajnog povećanja koncentracije LPA u mozgu i u likvoru (Yung i sur., 2015). Ujedno, pokazano je da promjene razine LPA i posljedično signalizacije posredovane LPA mogu doprinijeti patologiji AB jer, između ostalog, LPA povećava aktivnost enzima GSK3 $\beta$  i BACE1 u mozgu (Shi i sur., 2013; Ahmad i sur., 2020). Zbog navedenih uloga LPA u mozgu i činjenice da nije utvrđen u malom mozgu miševa wt nego samo u miševima NPC1 pretpostavljamo da povećana razina LPA može pridonijeti patološkim promjenama u malom mozgu miševa NPC1.

Drugi lizofosfolipid za koji je uočeno značajno povećanje u hipokampusu 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na hipokampus miševa wt je LPE O-. Još uvijek nije poznata biološka funkcija ovog lizofosfolipida, osim da je prekursorska molekula za sintezu PE O-. Značajne promjene razine LPE O- u hipokampusu miševa NPC1 ukazuju da se promjene lipidnog sastava

događaju i u hipokampusu, moždanoj regiji koja se smatra očuvanom (najmanje zahvaćenom) u bolesti NPC (German i sur., 2001).

Nadalje, samo u moždanim regijama miševa NPC1 je utvrđen LPG koji je potreban za sintezu fosfatidilglicerola (PG) glavnog prekursora mnogih lipida (Makide 2009). No o drugim biološkim ulogama LPG u organizmu se vrlo malo zna. Povišene razine LPG su utvrđene u akutnom koronarnom sindromu te se smatra da bi mogao biti povezan s kardiovaskularnim bolestima. Njegova uloga u mozgu još uvijek nije istražena. Jedina studija objavljena do danas je pokazala da su razine LPG značajno povišene u *post mortem* mozgovima pacijenata u ranoj fazi AB, dok u mozgovima pacijenata u kasnijoj fazi AB njegova razina nije bila značajno promijenjena u odnosu na zdrave kontrole (Akyol i sur., 2021). Također, LPG je pokazao različitu raspodjelu u endosomskim frakcijama, gdje je detektiran samo u frakcijama ranih endosoma izoliranim iz hipokampusu miševa wt i malog mozga miševa NPC1. Činjenica da je LPG detektiran u homogenatima i endosomskim frakcijama malog mozga miševa NPC1, a nije detektiran u malom mozgu miševa wt, bi moglo ukazati na njegovu potencijalnu ulogu u patološkim procesima u bolesti NPC.

U endosomskim frakcijama istaknuo se još i kardiolipin (CL) koje je utvrđen samo u endosomskim frakcijama malog mozga miševa NPC1. Zanimljivo je da se on primarno nalazi u mitohondrijskim membranama. Poznato je da kardiolipin ima ulogu u apoptozi, mitofagiji i degradaciji mitohondrija, no njihove uloge u ostalim organelima ili dijelovima stanice nisu poznate (Kagan, i sur., 2005; Pizzuto i Pelegrin, 2020). Lipidi čak i u malim koncentracijama značajno utječu na svojstva membrana te potencijalno mogu poremetiti lipidni sastav membrana ranih endosoma koje sadrže specifične proteine i lipide koji im daju identitet i reguliraju interakciju s drugim proteinima (Jovic i sur., 2010; Huotari i Helenius, 2011). Narušena interakcija ranih endosoma i drugih proteina ometa njihovo sazrijevanje i funkciju što dovodi do promijenjene morfologije ranih endosoma koja je uočena u AB, bolesti NPC i u drugim neurodegenerativnim poremećajima (Jin i sur., 2004; Nixon, 2005). Stoga bi utvrđene promjene LPG i CL u frakcijama ranih endosoma malog mozga miševa NPC1 potencijalno mogle utjecati na lipidni sastav membrana ranih endosoma i samim time na njihovo sazrijevanje i interakciju s proteinima. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se točno utvrdio učinak promjena LPG i CL na disfunkciju vezikula ranih endosoma.

Sumarno, analize lipidoma su pokazale da već u ranoj fazi bolesti NPC, tj. u fenotipski zdravih miševa NPC1 postoje promjene u raspodjeli i razini lipida u malom mozgu i u hipokampusu u odnosu na wt kao i u endosomskim frakcijama malog mozga miševa NPC1.

Uočene promjene sastava lipida mogu imati važnu ulogu u patološkim procesima u bolesti NPC, kao i u razvoju novih terapijskih strategija za liječenje ove još uvijek neizlječive bolesti.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom radu otkrili smo da zbog nedostatka funkcionalnog proteina NPC1 koji uzrokuje nastanak bolesti NPC dolazi do povećanog cijepanja ključnim enzimom Alzheimerove bolesti, proteazom BACE1 u primarnim kulturama neurona. Naime, supstrati Sez6 i Sez6L, koji se isključivo cijepaju enzimom BACE1, su pokazali povećanu proteolitičku razgradnju u neuronima NPC1 u odnosu na wt.

Utvrđen promijenjen transport te nakupljanje supstrata Sez6 i Sez6L u ranim endosomima neurona NPC1 je najvjerojatniji uzrok njihovog povećanog cijepanja proteazom BACE1. Analiza moždanih regija malog mozga i hipokampusa metodom endolizosomskog frakcioniranja je utvrdila različitu raspodjelu BACE1 supstrata Sez6 i Sez6L u ovim moždanim regijama, ukazujući na njihovu potencijalnu različitu funkciju u mozgu.

Inhibicija proteaze BACE1 djelomično je popravila patološke karakteristike bolesti NPC, uključujući nakupljanje supstrata Sez6 i Sez6L u ranim endosomima, disfunkciju ranih endosoma, povišenu razinu proteina tau te neuroinflamaciju (aktivaciju astrocita i mikroglia). Ovaj rezultat ukazuje na doprinos proteaze BACE1 i njenog povećanog cijepanja nastanku patoloških promjena u bolesti NPC.

Analiza lipidoma moždanih regija hipokampusa i malog mozga te ranih endosoma je utvrdila promjene određenih lipida već u asimptomatskoj fazi bolesti NPC, sugerirajući da narušena homeostaza lipida ima ulogu u patogenezi NPC te da može predstavljati rani okidač kaskade patoloških promjene u ovoj bolesti. Najznačajnije promjene u malom mozgu miševa NPC1 su uočene za lipide DAG, TAG, LPA i LPG, a u hipokampusu za lipid LPE O- u odnosu na iste regije wt miševa. U ranim endosomima malog mozga miševa NPC1 u odnosu na wt detektirane su značajne promjene u razini kardiolipina i LPG. Ovi rezultati ukazuju na potencijalnu ulogu ovih lipidnih promjena na vulnerabilnost moždanih regija malog mozga u odnosu na hipokampus u bolesti NPC kao i na disfunkciju ranih endosoma.

Sumarno, dobiveni rezultati u sklopu ovog doktorata doprinose boljem razumijevanju bolesti NPC te otkrivanju novih potencijalnih za razvoj terapije protiv ove još uvijek neizlječive bolesti.



## 7. LITERATURA

1. [www.alzforum.org](http://www.alzforum.org)
2. [www.lipotype.org](http://www.lipotype.org)
3. Ahmad, S., Orellana, A., Kohler, I., Frölich, L., De Rojas, I., Gil, S., Boada, M., Hernández, I., Hausner, L., Bakker, M. H. M., Cabrera-Socorro, A., Amin, N., Ramírez, A., Ruiz, A., Hankemeier, T., & Van Duijn, C. M. (2020). Association of lysophosphatidic acids with cerebrospinal fluid biomarkers and progression to Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00680-9>
4. Akyol, S., Ugur, Z., Yilmaz, A., Ustun, I., Gorti, S. K. K., Oh, K., McGuinness, B., Passmore, P., Kehoe, P. G., Maddens, M. E., Green, B. D., & Graham, S. F. (2021). Lipid profiling of Alzheimer's disease brain highlights enrichment in glycerol(Phospho)lipid, and sphingolipid metabolism. *Cells*, *10*(10). <https://doi.org/10.3390/cells10102591>
5. Alobaidy, H. (2015). Recent Advances in the Diagnosis and Treatment of Niemann-Pick Disease Type C in Children: A Guide to Early Diagnosis for the General Pediatrician. *International Journal of Pediatrics*, *2015*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/816593>
6. Anliker, B., Choi, J. W., Lin, M. E., Gardell, S. E., Rivera, R. R., Kennedy, G., & Chun, J. (2013). Lysophosphatidic acid (LPA) and its receptor, LPA1, influence embryonic schwann cell migration, myelination, and cell-to-axon segregation. *Glia*, *61*(12), 2009–2022. <https://doi.org/10.1002/glia.22572>
7. Auer, I. A., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Curry, B., Suzuki, K., Shin, R. W., Pentchev, P. G., Carstea, E. D., & Trojanowski, J. Q. (1995). Paired helical filament tau (PHFtau) in Niemann-Pick type C disease is similar to PHFtau in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *90*(6), 547–551. <https://doi.org/10.1007/BF00318566>
8. Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., & Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in neurological diseases: A road map to brain-disease dependent-inflammatory response. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(December), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488>
9. Barão, S., Moechars, D., Lichtenthaler, S. F., & De Strooper, B. (2016). BACE1 Physiological Functions May Limit Its Use as Therapeutic Target for Alzheimer's Disease. *Trends in Neurosciences*, *39*(3), 158–169. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.003>
10. Baudry, M., Yao, Y., Simmons, D., Liu, J., & Bi, X. (2003). Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann-Pick type C disease: Immunohistochemical observations of microglia and astroglia. *Experimental Neurology*, *184*(2), 887–903.

[https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00345-5](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00345-5)

11. Beaudoin, G. M. J., Lee, S. H., Singh, D., Yuan, Y., Ng, Y. G., Reichardt, L. F., & Arikath, J. (2012). Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature Protocols*, 7(9), 1741–1754. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.099>
12. Bernath, M. M., Bhattacharyya, S., Nho, K., Barupal, D. K., Fiehn, O., Baillie, R., Risacher, S. L., Arnold, M., Jacobson, T., Trojanowski, J. Q., Shaw, L. M., Weiner, M. W., Doraiswamy, P. M., Kaddurah-Daouk, R., & Saykin, A. J. (2020). Serum triglycerides in Alzheimer disease: Relation to neuroimaging and CSF biomarkers. *Neurology*, 94(20), E2088–E2098. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000009436>
13. Blennow, K., Leon, M. J. De, & Zetterberg, H. (2006). *Alzheimer ' s disease*. 368, 387–403.
14. Bonnot, O., Klünemann, H. H., Velten, C., Torres Martin, J. V., & Walterfang, M. (2019). Systematic review of psychiatric signs in Niemann-Pick disease type C. *World Journal of Biological Psychiatry*, 20(4), 320–332. <https://doi.org/10.1080/15622975.2018.1441548>
15. Bräuer, A. U., Kuhla, A., Holzmann, C., Wree, A., & Witt, M. (2019). Current challenges in understanding the cellular and molecular mechanisms in niemann-pick disease type C1. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms20184392>
16. Bu, B., Klunemann, H., Suzuki, K., Li, J., Bird, T., Jin, L. W., & Vincent, I. (2002). Niemann-Pick disease type C yields possible clue for why cerebellar neurons do not form neurofibrillary tangles. *Neurobiology of Disease*, 11(2), 285–297. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0551>
17. Burns, A. (2009). Alzheimer's disease: on the verges of treatment and prevention. *The Lancet Neurology*, 8(1), 4–5. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70271-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70271-0)
18. Burns, M., Gaynor, K., Olm, V., Mercken, M., LaFrancois, J., Wang, L., Mathews, P. M., Noble, W., Matsuoka, Y., & Duff, K. (2003). Presenilin redistribution associated with aberrant cholesterol transport enhances  $\beta$ -amyloid production in vivo. *Journal of Neuroscience*, 23(13), 5645–5649. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-13-05645.2003>
19. Burns, M. P., Igbavboa, U., Wang, L., Wood, W. G., & Duff, K. (2006). Cholesterol distribution, not total levels, correlate with altered amyloid precursor protein processing in statin-treated mice. *NeuroMolecular Medicine*, 8(3), 319–328. <https://doi.org/10.1385/NMM:8:3:319>
20. Callender, J. A., & Newton, A. C. (2017). Conventional protein kinase C in the brain: 40 years later. *Neuronal Signaling*, 1(2), 1–10. <https://doi.org/10.1042/ns20160005>

21. Cariati, I., Masuelli, L., Bei, R., Tancredi, V., Frank, C., & D'arcangelo, G. (2021). Neurodegeneration in niemann–pick type c disease: An updated review on pharmacological and non-pharmacological approaches to counteract brain and cognitive impairment. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126600>
22. Cataldo, A. M., Petanceska, S., Terio, N. B., Peterhoff, C. M., Durham, R., Mercken, M., Mehta, P. D., Buxbaum, J., Haroutunian, V., & Nixon, R. A. (2004). A $\beta$  localization in abnormal endosomes: Association with earliest A $\beta$  elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiology of Aging*, 25(10), 1263–1272. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.02.027>
23. Causevic, M., Dominko, K., Malnar, M., Vidatic, L., Cermak, S., Pigoni, M., Kuhn, P. H., Colombo, A., Havas, D., Flunkert, S., McDonald, J., Gunnensen, J. M., Hutter-Paier, B., Tahirovic, S., Windisch, M., Krainc, D., Lichtenthaler, S. F., & Hecimovic, S. (2018). BACE1-cleavage of Sez6 and Sez6L is elevated in Niemann-Pick type C disease mouse brains. *PLoS ONE*, 13(7), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200344>
24. Chami, L., & Checler, F. (2012). BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and  $\beta$ -amyloid production in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*, 7, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-52>
25. Chan, R. B., Oliveira, T. G., Cortes, E. P., Honig, L. S., Duff, K. E., Small, S. A., Wenk, M. R., Shui, G., & Di Paolo, G. (2012). Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2678–2688. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.274142>
26. Chow, V. W., Mattson, M. P., Wong, P. C., & Gleichmann, M. (2010). An overview of APP processing enzymes and products. *Neuromolecular medicine*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s12017-009-8104-z>
27. Cole, S. L., & Vassar, R. (2007). The Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase enzyme, BACE1. *Molecular Neurodegeneration*, 2(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-2-22>
28. Cologna, S. M., Cluzeau, C. V. M., Yanjanin, N. M., Blank, P. S., Dail, M. K., Siebel, S., Toth, C. L., Wassif, C. A., Lieberman, A. P., & Porter, F. D. (2014). Human and mouse neuroinflammation markers in Niemann-Pick disease, type C1. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 37(1), 83–92. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9610-6>
29. Cologna, S. M., & Rosenhouse-Dantsker, A. (2019). Insights into the molecular mechanisms of cholesterol binding to the NPC1 and NPC2 proteins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1135, 139–160. <https://doi.org/10.1007/978-3-030->

30. Colombo, E., & Farina, C. (2016). Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends in Immunology*, *37*(9), 608–620. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.06.006>
31. Cordy, J. M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N. M., & Turner, A. J. (2003). Exclusively targeting  $\beta$ -secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates  $\beta$ -site processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(20), 11735–11740. <https://doi.org/10.1073/pnas.1635130100>
32. Cossec, J. C., Simon, A., Marquer, C., Moldrich, R. X., Leterrier, C., Rossier, J., Duyckaerts, C., Lenkei, Z., & Potier, M. C. (2010). Clathrin-dependent APP endocytosis and A $\beta$  secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1801*(8), 846–852. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2010.05.010>
33. Cougnoux, A., Drummond, R. A., Collar, A. L., Iben, J. R., Salman, A., Westgarth, H., Wassif, C. A., Cawley, N. X., Farhat, N. Y., Ozato, K., Lionakis, M. S., & Porter, F. D. (2018). Microglia activation in Niemann-Pick disease, type C1 is amenable to therapeutic intervention. *Human Molecular Genetics*, *27*(12), 2076–2089. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy112>
34. Croft, C. L., Futch, H. S., Moore, B. D., & Golde, T. E. (2019). Organotypic brain slice cultures to model neurodegenerative proteinopathies. *Molecular Neurodegeneration*, *14*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0346-0>
35. Cvitanovic-Šojat, L., Malenica, M., Kukuruzovic, M., Žigman, T., Kužnik, K., & Bielen, A. (2014). Niemann-pick disease type C: Mutations of NPC1 gene and the course of disease. *Paediatrica Croatica*, *58*(4), 255–261. <https://doi.org/10.13112/PC.2014.45>
36. Das, B., & Yan, R. (2017). Role of BACE1 in Alzheimer's synaptic function. *Translational Neurodegeneration*, *6*(1), 4–11. <https://doi.org/10.1186/s40035-017-0093-5>
37. Das, B., & Yan, R. (2019). A Close Look at BACE1 Inhibitors for Alzheimer's Disease Treatment. *CNS Drugs*, *33*(3), 251–263. <https://doi.org/10.1007/s40263-019-00613-7>
38. Davidson, C. D., Ali, N. F., Micsenyi, M. C., Stephney, G., Renault, S., Dobrenis, K., Ory, D. S., Vanier, M. T., & Walkley, S. U. (2009). Chronic cyclodextrin treatment of murine Niemann-Pick C disease ameliorates neuronal cholesterol and glycosphingolipid storage and disease progression. *PLoS ONE*, *4*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006951>
39. Dey, M., Gunn-Moore, F. J., Platt, B., & Smith, T. K. (2020). Brain region-specific lipid alterations in the PLB4 hBACE1 knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Lipids in*

- Health and Disease*, 19(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01367-8>
40. Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2004). Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *Journal of Lipid Research*, 45(8), 1375–1397. <https://doi.org/10.1194/jlr.R400004-JLR200>
  41. Dimache, A. M., Şalaru, D. L., Sascău, R., & Stătescu, C. (2021). The role of high triglycerides level in predicting cognitive impairment: A review of current evidence. *Nutrients*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/nu13062118>
  42. Distl, R., Treiber-Held, S., Albert, F., Meske, V., Harzer, K., & Ohm, T. G. (2003). Cholesterol storage and tau pathology in Niemann-Pick type C disease in the brain. *Journal of Pathology*, 200(1), 104–111. <https://doi.org/10.1002/path.1320>
  43. Dixit, S. S., Jadot, M., Sohar, I., Sleat, D. E., Stock, A. M., & Lobel, P. (2011). Loss of niemann-pick C1 or C2 protein results in similar biochemical changes suggesting that these proteins function in a common lysosomal pathway. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023677>
  44. Dominko, K., Rastija, A., Sobocanec, S., Vidatic, L., Meglaj, S., Babic, A. L., Hutter-Paier, B., Colombo, A. V., Lichtenthaler, S. F., Tahirovic, S., & Hecimovic, S. (2021). Impaired retromer function in niemann-pick type c disease is dependent on intracellular cholesterol accumulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 1–27. <https://doi.org/10.3390/ijms222413256>
  45. Ehehalt, R., Keller, P., Haass, C., Thiele, C., & Simons, K. (2003). Amyloidogenic processing of the Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *Journal of Cell Biology*, 160(1), 113–123. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207113>
  46. Evans, W. R. H., & Hendriksz, C. J. (2017). Niemann-Pick type C disease – the tip of the iceberg? A review of neuropsychiatric presentation, diagnosis and treatment. *BJPsych Bulletin*, 41(2), 109–114. <https://doi.org/10.1192/pb.bp.116.054072>
  47. Feringa, F. M., & van der Kant, R. (2021). Cholesterol and Alzheimer’s Disease; From Risk Genes to Pathological Effects. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 13(June), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.690372>
  48. Fu, R., Yanjanin, N. M., Elrick, M. J., Ware, C., Lieberman, A. P., & Porter, F. D. (2012). Apolipoprotein E genotype and neurological disease onset in Niemann-Pick disease, type C1. *American Journal of Medical Genetics, Part A*, 158 A(11), 2775–2780. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35395>
  49. Fukumoto, H., Cheung, B. S., Hyman, B. T., & Irizarry, M. C. (2002).  $\beta$ -secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Archives of Neurology*,

- 59(9), 1381–1389. <https://doi.org/10.1001/archneur.59.9.1381>
50. Fukumoto, H., Takahashi, H., Tarui, N., Matsui, J., Tomita, T., Hirode, M., Sagayama, M., Maeda, R., Kawamoto, M., Hirai, K., Terauchi, J., Sakura, Y., Kakihana, M., Kato, K., Iwatsubo, T., & Miyamoto, M. (2010). A Noncompetitive BACE1 Inhibitor TAK-070 ameliorates a $\beta$  pathology and behavioral deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience*, 30(33), 11157–11166. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2884-10.2010>
51. García-Morales, V., González-Acedo, A., Melguizo-Rodríguez, L., Pardo-Moreno, T., Costela-Ruiz, V. J., Montiel-Troya, M., & Ramos-Rodríguez, J. J. (2021). Current understanding of the physiopathology, diagnosis and therapeutic approach to alzheimer's disease. *Biomedicines*, 9(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9121910>
52. Gatz, M., Reynolds, C. A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. A., Berg, S., Fiske, A., & Pedersen, N. L. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Archives of General Psychiatry*, 63(2), 168–174. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.2.168>
53. German, D. C., Matthew Quintero, E., Liang, C. L., Ng, B., Punia, S., Xie, C., & Dietschy, J. M. (2001). Selective neurodegeneration, without neurofibrillary tangles, in a mouse model of Niemann-Pick C disease. *Journal of Comparative Neurology*, 433(3), 415–425. <https://doi.org/10.1002/cne.1149>
54. Ginsberg, S. D., Alldred, M. J., Counts, S. E., Cataldo, A. M., Neve, R. L., Jiang, Y., Wu, J., Chao, M. V, & Mufson, E. J. (2011). *progression*. 68(10), 885–893. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.05.030>.Microarray
55. Gunnarsen, J. M., Kim, M. H., Fuller, S. J., De Silva, M., Britto, J. M., Hammond, V. E., Davies, P. J., Petrou, S., Faber, E. S. L., Sah, P., & Tan, S. S. (2007). Sez-6 Proteins Affect Dendritic Arborization Patterns and Excitability of Cortical Pyramidal Neurons. *Neuron*, 56(4), 621–639. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.09.018>
56. Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(5), 1–26. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>
57. Hammond, N., Munkacsy, A. B., & Sturley, S. L. (2019). The complexity of a monogenic neurodegenerative disease: More than two decades of therapeutic driven research into Niemann-Pick type C disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(8), 1109–1123. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.04.002>
58. Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's Disease: The Amyloid Alzheimer's

- disease. *Science*, 256(5054), 184–185. <http://doi.org/10.1126/science.1566067>.
59. Hardy, J., & Selkoe, D. J. (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297(5580), 353–356. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>
60. Hastings, C., Vieira, C., Liu, B., Bascon, C., Gao, C., Wang, R. Y., Casey, A., & Hrynkow, S. (2019). Expanded access with intravenous hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin to treat children and young adults with Niemann-Pick disease type C1: A case report analysis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13023-019-1207-1>
61. Hemming, M. L., Elias, J. E., Gygi, S. P., & Selkoe, D. J. (2009). Identification of  $\beta$ -secretase (BACE1) substrates using quantitative proteomics. *PLoS ONE*, 4(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008477>
62. Henderson, V. W., Guthrie, J. R., & Dennerstein, L. (2003). Middle Age Women. *Lancet*, 1530–1536.
63. Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). Alzheimer's disease: The challenge of the second century. *Science Translational Medicine*, 3(77), 1–35. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002369>
64. Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. *EMBO Journal*, 30(17), 3481–3500. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
65. Ikonen, E. (2006). Mechanisms for cellular cholesterol transport: Defects and human disease. *Physiological Reviews*, 86(4), 1237–1261. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2005>
66. Infante, R. E., Wang, M. L., Radhakrishnan, A., Hyock, J. K., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (2008). NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15287–15292. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807328105>
67. Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M. P., Van Gorp, S., Nazor, K. L., Boscolo, F. S., Carson, C. T., Laurent, L. C., Marsala, M., Gage, F. H., Remes, A. M., Koo, E. H., & Goldstein, L. S. B. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482(7384), 216–220. <https://doi.org/10.1038/nature10821>
68. Jiang, X., & Ory, D. S. (2021). Advancing diagnosis and treatment of Niemann-Pick C disease through biomarker discovery. *Exploration of Neuroprotective Therapy*, 146–158.

<https://doi.org/10.37349/ent.2021.00012>

69. Jiang, Y., Mullaney, K. A., Peterhoff, C. M., Che, S., Schmidt, S. D., Boyer-Boiteau, A., Ginsberg, S. D., Cataldo, A. M., Mathews, P. M., & Nixon, R. A. (2010). Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is A $\beta$ -independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(4), 1630–1635. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908953107>
70. Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Bjornsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhangale, T., Graham, R. R., Huttenlocher, J., Bjornsdottir, G., Andreassen, O. A., ... Stefansson, K. (2012). A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, *488*(7409), 96. <https://doi.org/10.1038/nature11283>
71. Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J., & Caplan, S. (2010). The early endosome: A busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histology and Histopathology*, *25*(1), 99–112. <https://doi.org/10.14670/HH-25.99>
72. Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., Osipov, A. N., Belikova, N. A., Kapralov, A. A., Kini, V., Vlasova, I. I., Zhao, Q., Zou, M., Di, P., Svistunenko, D. A., Kurnikov, I. V., & Borisenko, G. G. (2005). Cytochrome C Acts As A Cardiolipin Oxygenase Required for Release of Proapoptotic Factors. *Nature Chemical Biology*, *1*(4), 223–232. <https://doi.org/10.1038/nchembio727>
73. Kametani, F., & Hasegawa, M. (2018). Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Frontiers in Neuroscience*, *12*(JAN). <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>
74. Kandalepas, P. C., Sadleir, K. R., Eimer, W. A., Zhao, J., Nicholson, D. A., & Vassar, R. (2013). The Alzheimer's  $\beta$ -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathologica*, *126*(3), 329–352. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1152-3>
75. Kandalepas, P. C., & Vassar, R. (2012). Identification and biology of  $\beta$ -secretase. *Journal of Neurochemistry*, *120*(SUPPL. 1), 55–61. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07512.x>
76. Kaur, G. et al. (2017). Lysosomal dysfunction in the brain of a mouse model with intraneuronal accumulation of carboxyl terminal fragments of the amyloid precursor protein HHS Public Access. *Molecular Psychiatry*, *22*(7), 981–989. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.189>.Lysosomal
77. Kennedy, M. E., Stamford, A. W., Chen, X., Cox, K., Cumming, J. N., Dockendorf, M. F.,



- Egan, M., Ereshefsky, L., Hodgson, R. A., Hyde, L. A., Jhee, S., Kleijn, H. J., Kuvelkar, R., Li, W., Mattson, B. A., Mei, H., Palcza, J., Scott, J. D., Tanen, M., ... Forman, M. S. (2016). The BACE1 inhibitor verubecestat (MK-8931) reduces CNS b-Amyloid in animal models and in Alzheimer's disease patients. *Science Translational Medicine*, 8(363), 1–14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad9704>
78. Kim, K., Yang, J., & Kim, E. (2010). Diacylglycerol kinases in the regulation of dendritic spines. *Journal of Neurochemistry*, 112(3), 577–587. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06499.x>
79. Kim, M. H., Gunnarsen, J. M., & Tan, S. S. (2002). Localized expression of the seizure-related gene SEZ-6 in developing and adult forebrains. *Mechanisms of Development*, 118(1–2), 171–174. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00238-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00238-1)
80. Kim, S., Sato, Y., Mohan, P. S., Peterhoff, C., Pensalfini, A., Rigoglioso, A., Jiang, Y., & Nixon, R. A. (2016). Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP- $\beta$ CTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Molecular Psychiatry*, 21(5), 707–716. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.97>
81. Ko, D. C., Milenkovic, L., Beier, S. M., Manuel, H., Buchanan, J. A., & Scott, M. P. (2005). Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in niemann-pick type C disease. *PLoS Genetics*, 1(1), 0081–0095. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010007>
82. Kodam, A., Maulik, M., Peake, K., Amritraj, A., Vetrivel, K. S., Thinakaran, G., Vance, J. E., & Kar, S. (2010). Altered levels and distribution of amyloid precursor protein and its processing enzymes in Niemann-Pick type C1-deficient mouse brains. *Glia*, 58(11), 1267–1281. <https://doi.org/10.1002/glia.21001>
83. Kolczynska, K., Loza-Valdes, A., Hawro, I., & Sumara, G. (2020). Diacylglycerol-evoked activation of PKC and PKD isoforms in regulation of glucose and lipid metabolism: A review. *Lipids in Health and Disease*, 19(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12944-020-01286-0>
84. Korolev, I. O. (2014). Alzheimer 's Disease : A Clinical and Basic Science Review. *Medical Student Research Journal*, 04(September), 24–33.
85. Kosicek, M., Malnar, M., Goate, A., & Hecimovic, S. (2010). Cholesterol accumulation in Niemann Pick type C (NPC) model cells causes a shift in APP localization to lipid rafts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 393(3), 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.007>
86. Krasnobaev, V. D., Galimzyanov, T. R., Akimov, S. A., & Batishchev, O. V. (2022).

- Lysolipids regulate raft size distribution. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 9(October), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1021321>
87. Kuhn, P. H., Koroniak, K., Hogl, S., Colombo, A., Zeitschel, U., Willem, M., Volbracht, C., Schepers, U., Imhof, A., Hoffmeister, A., Haass, C., Roner, S., Bräse, S., & Lichtenthaler, S. F. (2012). Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons. *EMBO Journal*, 31(14), 3157–3168. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.173>
88. LaDu, M. J., Falduto, M. T., Manelli, A. M., Reardon, C. A., Getz, G. S., & Frail, D. E. (1994). Isoform-specific binding of apolipoprotein E to  $\beta$ -amyloid. *Journal of Biological Chemistry*, 269(38), 23403–23406. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)31529-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)31529-6)
89. Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bourgeois, A., Bécot, A., & Checler, F. (2019). Does Intraneuronal Accumulation of Carboxyl-terminal Fragments of the Amyloid Precursor Protein Trigger Early Neurotoxicity in Alzheimer's Disease? *Current Alzheimer Research*, 16(5), 453–457. <https://doi.org/10.2174/1567205016666190325092841>
90. Lauritzen, Inger, Pardossi-Piquard, R., Bauer, C., Brigham, E., Abraham, J. D., Ranaldi, S., Fraser, P., St-George-Hyslop, P., Le Thuc, O., Espin, V., Chami, L., Dunys, J., & Checler, F. (2012). The  $\beta$ -secretase-derived C-terminal fragment of  $\beta$ APP, C99, but not A $\beta$ , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 32(46), 16243–16255. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2775-12.2012>
91. Lauritzen, Inger, Pardossi-Piquard, R., Bourgeois, A., Pagnotta, S., Biferi, M. G., Barkats, M., Lacor, P., Klein, W., Bauer, C., & Checler, F. (2016). Intraneuronal aggregation of the  $\beta$ -CTF fragment of APP (C99) induces A $\beta$ -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathologica*, 132(2), 257–276. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1577-6>
92. Li, X., Wang, J., Coutavas, E., Shi, H., Hao, Q., & Blobel, G. (2016). Structure of human Niemann-Pick C1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 8212–8217. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607795113>
93. Lloret, A., Fuchsberger, T., Giraldo, E., & Viña, J. (2015). Molecular mechanisms linking amyloid  $\beta$  toxicity and Tau hyperphosphorylation in Alzheimers disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 83, 186–191. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.028>
94. Long, J. M., & Holtzman, D. M. (2019). Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*, 179(2), 312–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
95. Maccarrone, G., Ditzen, C., Yassouridis, A., Rewerts, C., Uhr, M., Uhlen, M., Holsboer,

- F., & Turck, C. W. (2013). Psychiatric patient stratification using biosignatures based on cerebrospinal fluid protein expression clusters. *Journal of Psychiatric Research*, 47(11), 1572–1580. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.07.021>
96. Malnar, M., Hecimovic, S., Mattsson, N., & Zetterberg, H. (2014). Bidirectional links between Alzheimer's disease and Niemann-Pick type C disease. *Neurobiology of Disease*, 72(Part A), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.05.033>
97. Malnar, M., Košiček, M., & Hećimović, S. (2009). Alzheimerova bolest: Od molekularnog mehanizma do rane dijagnoze. *Medicina*, 45(3), 234–243.
98. Malnar, M., Kosicek, M., Lisica, A., Posavec, M., Krolo, A., Njavro, J., Omerbasic, D., Tahirovic, S., & Hecimovic, S. (2012). Cholesterol-depletion corrects APP and BACE1 mistrafficking in NPC1-deficient cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1822(8), 1270–1283. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.04.002>
99. Malnar, M., Kosicek, M., Mitterreiter, S., Omerbasic, D., Lichtenthaler, S. F., Goate, A., & Hecimovic, S. (2010). Niemann-Pick type C cells show cholesterol dependent decrease of APP expression at the cell surface and its increased processing through the  $\beta$ -secretase pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(7–8), 682–691. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.05.006>
100. Maloney, J. A., Bainbridge, T., Gustafson, A., Zhang, S., Kyauk, R., Steiner, P., Van Der Brug, M., Liu, Y., Ernst, J. A., Watts, R. J., & Atwal, J. K. (2014). Molecular mechanisms of Alzheimer disease protection by the A673T allele of amyloid precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 30990–31000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589069>
101. Marquer, C., Devauges, V., Cossec, J. C., Liot, G., Lécart, S., Saudou, F., Duyckaerts, C., Lévêque-Fort, S., & Potier, M. C. (2011). Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB Journal*, 25(4), 1295–1305. <https://doi.org/10.1096/fj.10-168633>
102. Marschalek, N., Albert, F., Meske, V., & Ohm, T. G. (2014). The natural history of cerebellar degeneration of Niemann-Pick C mice monitored in vitro. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(7), 933–945. <https://doi.org/10.1111/nan.12154>
103. Mattsson, N., Zetterberg, H., Bianconi, S., Yanjanin, N. M., Fu, R., Månsson, J. E., Porter, F. D., & Blennow, K. (2011).  $\gamma$ -Secretase-dependent amyloid- $\beta$  is increased in Niemann-Pick type C: A cross-sectional study. *Neurology*, 76(4), 366–372. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318208f4ab>
104. Mattsson, Niklas, Olsson, M., Gustavsson, M. K., Kosicek, M., Malnar, M., Månsson,

- J. E., Blomqvist, M., Gobom, J., Andreasson, U., Brinkmalm, G., Vite, C., Hecimovic, S., Hastings, C., Blennow, K., Zetterberg, H., & Portelius, E. (2012). Amyloid- $\beta$  metabolism in Niemann-Pick C disease models and patients. *Metabolic Brain Disease*, *27*(4), 573–585. <https://doi.org/10.1007/s11011-012-9332-8>
105. Maulik, M., Ghoshal, B., Kim, J., Wang, Y., Yang, J., Westaway, D., & Kar, S. (2012). Mutant human APP exacerbates pathology in a mouse model of NPC and its reversal by a  $\beta$ -cyclodextrin. *Human Molecular Genetics*, *21*(22), 4857–4875. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddc322>
106. McConlogue, L., Buttini, M., Anderson, J. P., Brigham, E. F., Chen, K. S., Freedman, S. B., Games, D., Johnson-Wood, K., Lee, M., Zeller, M., Liu, W., Motter, R., & Sinha, S. (2007). Partial reduction of BACE1 has dramatic effects on Alzheimer plaque and synaptic pathology in APP transgenic mice. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(36), 26326–26334. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611687200>
107. Meng, Y., Heybrock, S., Neculai, D., & Saftig, P. (2020). Cholesterol Handling in Lysosomes and Beyond. *Trends in Cell Biology*, *30*(6), 452–466. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.02.007>
108. Möller, T., Contos, J. J., Musante, D. B., Chun, J., & Ransom, B. R. (2001). Expression and Function of Lysophosphatidic Acid Receptors in Cultured Rodent Microglial Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(28), 25946–25952. <https://doi.org/10.1074/jbc.M102691200>
109. Mondragón-Rodríguez, S., Gu, N., Manseau, F., & Williams, S. (2018). Alzheimer's transgenic model is characterized by very early brain network alterations and  $\beta$ -CTF fragment accumulation: Reversal by  $\beta$ -secretase inhibition. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *12*(May). <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00121>
110. Morell, P., & Jurevics, H. (1996). Origin of cholesterol in myelin. *Neurochemical Research*, *21*(4), 463–470. <https://doi.org/10.1007/BF02527711>
111. Munro, K. M., Nash, A., Pignoni, M., Lichtenthaler, S. F., & Gunnarsen, J. M. (2016). Functions of the Alzheimer's Disease Protease BACE1 at the Synapse in the Central Nervous System. *Journal of Molecular Neuroscience*, *60*(3), 305–315. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0800-1>
112. Narita, M., Mizoguchi, H., Narita, M., Nagase, H., Suzuki, T., & Tseng, L. F. (2001). Involvement of spinal protein kinase C $\gamma$  in the attenuation of opioid  $\mu$ -receptor-mediated G-protein activation after chronic intrathecal administration of [d-Ala<sup>2</sup>,N-MePhe<sup>4</sup>,Gly-OI<sup>5</sup>]enkephalin. *Journal of Neuroscience*, *21*(11), 3715–3720.

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-11-03715.2001>

113. Nash, A., Aumann, T. D., Pignoni, M., Lichtenthaler, S. F., Takeshima, H., Munro, K. M., & Gunnensen, J. M. (2020). Lack of Sez6 Family Proteins Impairs Motor Functions, Short-Term Memory, and Cognitive Flexibility and Alters Dendritic Spine Properties. *Cerebral Cortex*, *30*(4), 2167–2184. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz230>
114. Neumann, U., Rueeger, H., MacHauer, R., Veenstra, S. J., Lueoend, R. M., Tintelnot-Blomley, M., Laue, G., Beltz, K., Vogg, B., Schmid, P., Friauff, W., Shimshek, D. R., Staufenbiel, M., & Jacobson, L. H. (2015). A novel BACE inhibitor NB-360 shows a superior pharmacological profile and robust reduction of amyloid- $\beta$  and neuroinflammation in APP transgenic mice. *Molecular Neurodegeneration*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13024-015-0033-8>
115. Neumann, U., Ufer, M., Jacobson, L. H., Rouzade-Dominguez, M., Huledal, G., Kolly, C., Lüönd, R. M., Machauer, R., Veenstra, S. J., Hurth, K., Rueeger, H., Tintelnot-Blomley, M., Staufenbiel, M., Shimshek, D. R., Perrot, L., Friauff, W., Dubost, V., Schiller, H., Vogg, B., ... Lopez Lopez, C. (2018). The BACE -1 inhibitor CNP 520 for prevention trials in Alzheimer's disease . *EMBO Molecular Medicine*, *10*(11), 1–18. <https://doi.org/10.15252/emmm.201809316>
116. Nixon, R. A. (2005). Endosome function and dysfunction in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Neurobiology of Aging*, *26*(3), 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2004.09.018>
117. Nixon, R. A. (2017). Amyloid precursor protein & endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: Inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB Journal*, *31*(7), 2729–2743. <https://doi.org/10.1096/fj.201700359>
118. Nixon, R. A., Mathews, P. M., & Cataldo, A. M. (2001). The neuronal endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, *3*(1), 97–107. <https://doi.org/10.3233/JAD-2001-3114>
119. Nunes, A., Pressey, S. N. R., Cooper, J. D., & Soriano, S. (2011). Loss of amyloid precursor protein in a mouse model of Niemann-Pick type C disease exacerbates its phenotype and disrupts tau homeostasis. *Neurobiology of Disease*, *42*(3), 349–359. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.01.028>
120. Ohno, M., Cole, S. L., Yasvoina, M., Zhao, J., Citron, M., Berry, R., Disterhoft, J. F., & Vassar, R. (2007). BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiology of Disease*, *26*(1), 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.12.008>

121. Osaki, G., Mitsui, S., & Yuri, K. (2011). The distribution of the seizure-related gene 6 (Sez-6) protein during postnatal development of the mouse forebrain suggests multiple functions for this protein: An analysis using a new antibody. *Brain Research*, *1386*, 58–69. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.02.025>
122. Pacheco, C. D., & Lieberman, A. P. (2008). The pathogenesis of Niemann-Pick type C disease: A role for autophagy? *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *10*(26), 1–14. <https://doi.org/10.1017/S146239940800080X>
123. Pallottini, V., & Pfrieger, F. W. (2020). Understanding and treating niemann–pick type c disease: Models matter. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(23), 1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms21238979>
124. Patterson, M. C., Hendriksz, C. J., Walterfang, M., Sedel, F., Vanier, M. T., & Wijburg, F. (2012). Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: An update. *Molecular Genetics and Metabolism*, *106*(3), 330–344. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.012>
125. Peake, K. B., & Vance, J. E. (2010). Defective cholesterol trafficking in Niemann-Pick C-deficient cells. *FEBS Letters*, *584*(13), 2731–2739. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.047>
126. Pentchev, P. G., Kruth, H. S., Comly, M. E., Butler, J. D., Vanier, M. T., Wenger, D. A., & Patel, S. (1986). Type C Niemann-Pick disease. A parallel loss of regulatory responses in both the uptake and esterification of low density lipoprotein-derived cholesterol in cultured fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(35), 16775–16780. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)66633-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)66633-5)
127. Pfeffer, S. R. (2016). Clues to NPC1-mediated cholesterol export from lysosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(29), 7941–7943. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608530113>
128. Pfeffer, S. R. (2019). NPC intracellular cholesterol transporter 1 (NPC1)-mediated cholesterol export from lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(5), 1706–1709. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.004165>
129. Pignoni, M., Gunnensen, J. M., & Lichtenthaler, S. F. (2017). Seizure-6 proteins highlight BACE1 functions in neurobiology. *Oncotarget*, *8*(5), 7214–7215. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13801>
130. Pignoni, M., Wanngren, J., Kuhn, P. H., Munro, K. M., Gunnensen, J. M., Takeshima, H., Feederle, R., Voytyuk, I., De Strooper, B., Levasseur, M. D., Hrupka, B. J., Müller, S. A., & Lichtenthaler, S. F. (2016). Seizure protein 6 and its homolog seizure 6-like protein are

- physiological substrates of BACE1 in neurons. *Molecular Neurodegeneration*, *11*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0134-z>
131. Pizzuto, M., & Pelegrin, P. (2020). Cardiolipin in Immune Signaling and Cell Death. *Trends in Cell Biology*, *30*(11), 892–903. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.09.004>
  132. Platt, N., Speak, A. O., Colaco, A., Gray, J., Smith, D. A., Williams, I. M., Wallom, K. L., & Platt, F. M. (2016). Immune dysfunction in Niemann-Pick disease type C. *Journal of Neurochemistry*, *136*, 74–80. <https://doi.org/10.1111/jnc.13138>
  133. Power, M. C., Rawlings, A., Sharrett, A. R., Bandeen-Roche, K., Coresh, J., Ballantyne, C. M., Pokharel, Y., Michos, E. D., Penman, A., Alonso, A., Knopman, D., Mosley, T. H., & Gottesman, R. F. (2018). Association of midlife lipids with 20-year cognitive change: A cohort study. *Alzheimer's and Dementia*, *14*(2), 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.07.757>
  134. Querfurth, H. W., & Laferla, F. M. (2018). *Alzheimer's Disease*. 329–344.
  135. Refolo, L. M., Pappolla, M. A., LaFrancois, J., Malester, B., Schmidt, S. D., Thomas-Bryant, T., Tint, G. S., Wang, R., Mercken, M., Petanceska, S. S., & Duff, K. E. (2001). A cholesterol-lowering drug reduces  $\beta$ -amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, *8*(5), 890–899. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0422>
  136. Refolo, Lorenzo M., Pappolla, M. A., Malester, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G. S., Sambamurti, K., & Duff, K. (2000). Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model. *Neurobiology of Disease*, *7*(4), 321–331. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0304>
  137. Roda, A., Serra-Mir, G., Montoliu-Gaya, L., Tiessler, L., & Villegas, S. (2022). Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. *Neural Regeneration Research*, *17*(8), 1666–1674. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.332127>
  138. Rodriguez-Lafrasse, C., Rousson, R., Pentchev, P. G., Louisot, P., & Vanier, M. T. (1994). Free sphingoid bases in tissues from patients with type C Niemann-Pick disease and other lysosomal storage disorders. *BBA - Molecular Basis of Disease*, *1226*(2), 138–144. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(94\)90021-3](https://doi.org/10.1016/0925-4439(94)90021-3)
  139. Roitman, M., Edgington-Mitchell, L. E., Mangum, J., Ziogas, J., Adamides, A. A., Myles, P., Choo-Bunnett, H., Bunnett, N. W., & Gunnensen, J. M. (2019). Sez6 levels are elevated in cerebrospinal fluid of patients with inflammatory pain-associated conditions. *Pain Reports*, *4*(2), 2–6. <https://doi.org/10.1097/PR9.0000000000000719>
  140. Roy, S., Zhang, B., Lee, V. M. Y., & Trojanowski, J. Q. (2005). Axonal transport

- defects: A common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathologica*, 109(1), 5–13. <https://doi.org/10.1007/s00401-004-0952-x>
141. Rutten, B. P. F., & Steinbusch, H. W. M. (2013). Current concepts in Alzheimer's Disease: Molecules, models and translational perspectives. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 8–10. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-8-33>
142. Saito, Y., Suzuki, K., Nanba, E., Yamamoto, T., Ohno, K., & Murayama, S. (2002). Niemann-Pick type C disease: Accelerated neurofibrillary tangle formation and amyloid  $\beta$  deposition associated with apolipoprotein E  $\epsilon$ 4 homozygosity. *Annals of Neurology*, 52(3), 351–355. <https://doi.org/10.1002/ana.10266>
143. Sathya, M., Premkumar, P., Karthick, C., Moorthi, P., Jayachandran, K. S., & Anusuyadevi, M. (2012a). BACE1 in Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta*, 414, 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.08.013>
144. Sathya, M., Premkumar, P., Karthick, C., Moorthi, P., Jayachandran, K. S., & Anusuyadevi, M. (2012b). BACE1 in Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta*, 414(October 2017), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.08.013>
145. Schägger, H. (2006). Tricine-SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1(1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
146. Schelle, J., Häsler, L. M., Göpfert, J. C., Joos, T. O., Vanderstichele, H., Stoops, E., Mandelkow, E. M., Neumann, U., Shimshek, D. R., Staufenbiel, M., Jucker, M., & Kaeser, S. A. (2017). Prevention of tau increase in cerebrospinal fluid of APP transgenic mice suggests downstream effect of BACE1 inhibition. *Alzheimer's and Dementia*, 13(6), 701–709. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.09.005>
147. Schilling, T., Stock, C., Schwab, A., & Eder, C. (2004). Functional importance of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration. *European Journal of Neuroscience*, 19(6), 1469–1474. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03265.x>
148. Scott, C., & Ioannou, Y. A. (2004). The NPC1 protein: Structure implies function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1685(1–3), 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.006>
149. Shammas, H., Kuech, E. M., Rizk, S., Das, A. M., & Naim, H. Y. (2019). Different Niemann-Pick C1 Genotypes Generate Protein Phenotypes that Vary in their Intracellular Processing, Trafficking and Localization. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41707-y>
150. Shi, J., Dong, Y., Cui, M. Z., & Xu, X. (2013). Lysophosphatidic acid induces increased



- BACE1 expression and A $\beta$  formation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1832(1), 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.09.010>
151. Shie, F. S. (2004). Erratum: Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid- $\beta$  precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities (American Journal of Pathology 164 (975-985)). *American Journal of Pathology*, 165(4), 1447.
152. Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
153. Solomon, D., Winkelman, A. C., Zee, D. S., Gray, L., & Büttner-Ennever, J. (2005). Niemann-Pick type C disease in two affected sisters: Ocular motor recordings and brain-stem neuropathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1039, 436–445. <https://doi.org/10.1196/annals.1325.041>
154. St George-Hyslop, P. H., & Petit, A. (2005). Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *Comptes Rendus - Biologies*, 328(2), 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.10.013>
155. Stern, G. (2014). Niemann-Pick's and Gaucher's diseases. *Parkinsonism and Related Disorders*, 20(SUPPL.1), 143–146. [https://doi.org/10.1016/S1353-8020\(13\)70034-8](https://doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70034-8)
156. Stoppini, L., Buchs, P. A., & Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2), 173–182. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90128-M](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90128-M)
157. Stützer, I., Selevsek, N., Esterházy, D., Schmidt, A., Aebersold, R., & Stoffel, M. (2013). Systematic proteomic analysis identifies  $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 2 and 1 (BACE2 and BACE1) substrates in pancreatic  $\beta$ -cells. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10536–10547. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.444703>
158. Subramanian, K., & Balch, W. E. (2008). NPC1/NPC2 function as a tag team duo to mobilize cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15223–15224. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808256105>
159. Tamayev, R., Matsuda, S., Arancio, O., & D'Adamio, L. (2012).  $\beta$ - but not  $\gamma$ -secretase proteolysis of APP causes synaptic and memory deficits in a mouse model of dementia. *EMBO Molecular Medicine*, 4(3), 171–179. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100195>
160. Tan, S. T., Ramesh, T., Toh, X. R., & Nguyen, L. N. (2020). Emerging roles of lysophospholipids in health and disease. *Progress in Lipid Research*, 80(August), 101068. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2020.101068>
161. Taylor, H. A., Przemyska, L., Clavane, E. M., & Meakin, P. J. (2022). BACE1: More

- than just a  $\beta$ -secretase. *Obesity Reviews*, 23(7), 1–17. <https://doi.org/10.1111/obr.13430>
162. Timmers, M., Streffer, J. R., Russu, A., Tominaga, Y., Shimizu, H., Shiraishi, A., Tatikola, K., Smekens, P., Börjesson-Hanson, A., Andreasen, N., Matias-Guiu, J., Baquero, M., Boada, M., Tesseur, I., Tritsmans, L., Van Nueten, L., & Engelborghs, S. (2018). Pharmacodynamics of atabecestat (JNJ-54861911), an oral BACE1 inhibitor in patients with early Alzheimer's disease: Randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Alzheimer's Research and Therapy*, 10(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13195-018-0415-6>
163. Trimbuch, T., Beed, P., Vogt, J., Schuchmann, S., Maier, N., Kintscher, M., Breustedt, J., Schuelke, M., Streu, N., Kieselmann, O., Brunk, I., Laube, G., Strauss, U., Battfeld, A., Wende, H., Birchmeier, C., Wiese, S., Sendtner, M., Kawabe, H., ... Nitsch, R. (2009). Synaptic PRG-1 Modulates Excitatory Transmission via Lipid Phosphate-Mediated Signaling. *Cell*, 138(6), 1222–1235. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.050>
164. Trinh, M. N., Brown, M. S., Seemann, J., Goldstein, J. L., & Lu, F. (2018). Lysosomal cholesterol export reconstituted from fragments of Niemann-Pick C1. *eLife*, 7, 1–14. <https://doi.org/10.7554/eLife.38564>
165. Uddin, M. S., Kabir, M. T., Jeandet, P., Mathew, B., Ashraf, G. M., Perveen, A., Bin-Jumah, M. N., Mousa, S. A., & Abdel-Daim, M. M. (2020). Nove
166. van der Kant, R., Langness, V. F., Herrera, C. M., Williams, D. A., Fong, L. K., Leestemaker, Y., Steenvoorden, E., Ryneerson, K. D., Brouwers, J. F., Helms, J. B., Ovaa, H., Giera, M., Wagner, S. L., Bang, A. G., & Goldstein, L. S. B. (2019). Cholesterol Metabolism Is a Druggable Axis that Independently Regulates Tau and Amyloid- $\beta$  in iPSC-Derived Alzheimer's Disease Neurons. *Cell Stem Cell*, 24(3), 363-375.e9. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.12.013>
167. Vanier, M. T. (2013). Niemann-Pick diseases. U *Handbook of Clinical Neurology* (1. izd., Sv. 113). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00041-1>
168. Vanier, M. T., & Millat, G. (2004). Structure and function of the NPC2 protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1685(1–3), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2004.08.007>
169. Vassar, R. (2004). *Robert Vassar\**. 23, 105–113.
170. Vassar, R. (2014). BACE1 inhibitor drugs in clinical trials for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 6(9), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13195-014-0089-7>
171. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow,

- D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M. A., Biere, A. L., Curran, E., Burgess, T., ... Citron, M. (1999).  $\beta$ -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286(5440), 735–741. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>
172. Vassar, R., & Kandalepas, P. C. (2011). The  $\beta$ -secretase enzyme BACE1 as a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research and Therapy*, 3(3), 1–6. <https://doi.org/10.1186/alzrt82>
173. Vite, C. H., Bagel, J. H., Swain, G. P., Prociuk, M., Sikora, T. U., Stein, V. M., O'Donnell, P., Ruane, T., Ward, S., Crooks, A., Li, S., Mauldin, E., Stellar, S., De Meulder, M., Kao, M. L., Ory, D. S., Davidson, C., Vanier, M. T., & Walkley, S. U. (2015). Intracisternal cyclodextrin prevents cerebellar dysfunction and Purkinje cell death in feline Niemann-Pick type C1 disease. *Science Translational Medicine*, 7(276), 1–16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010101>
174. Walkley, S. U., & Vanier, M. T. (2009). Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(4), 726–736. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.11.014>
175. Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Rowan, M. J., & Selkoe, D. J. (2002). Amyloid- $\beta$  oligomers: Their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochemical Society Transactions*, 30(4), 552–557. <https://doi.org/10.1042/BST0300552>
176. Weiner, J. A., & Chun, J. (1999). Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(9), 5233–5238. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.5233>
177. William Rebeck, G., Reiter, J. S., Strickland, D. K., & Hyman, B. T. (1993). Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer's disease: Allelic variation and receptor interactions. *Neuron*, 11(4), 575–580. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90070-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90070-8)
178. Xie, C., Burns, D. K., Turley, S. D., & Dietschy, J. M. (2000). Cholesterol is sequestered in the brains of mice with Niemann-Pick Type C disease but turnover is increased. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 59(12), 1106–1117. <https://doi.org/10.1093/jnen/59.12.1106>
179. Yamazaki, T., Chang, T. Y., Haass, C., & Ihara, Y. (2001). Accumulation and Aggregation of Amyloid  $\beta$ -Protein in Late Endosomes of Niemann-Pick Type C Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4454–4460. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009598200>
180. Yan, R. (2017). Physiological functions of the  $\beta$ -site amyloid precursor protein cleaving

- enzyme 1 and 2. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00097>
181. Yan, R., & Vassar, R. (2014). Targeting the  $\beta$  secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *The Lancet Neurology*, 13(3), 319–329. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70276-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70276-X)
182. Yang, L., Lindholm, K., Yan, R., Citron, M., Xia, W., Yang, X., Beach, T., Sue, L., Wong, P., Price, D., Li, R., Shen, Y., Yang, & Shen. (2003). Elevated  $\beta$  -secretase expression and enzymatic activity Measuring T-cell – mediated cytotoxicity using antibody to activated caspase 3. *Nature Medicine*, 9(1), 3–4. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514700?access\\_num=12514700&link\\_type=MED&dopt=Abstract%0Ahttps://doi.org/10.1038/nm0103-3](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514700?access_num=12514700&link_type=MED&dopt=Abstract%0Ahttps://doi.org/10.1038/nm0103-3)
183. Ye, J., & DeBose-Boyd, R. A. (2011). Regulation of cholesterol and fatty acid synthesis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(7), 1–13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004754>
184. Yung, Y. C., Mutoh, T., Lin, M. E., Noguchi, K., Rivera, R. R., Choi, J. W., Kingsbury, M. A., & Chun, J. (2011). Lysophosphatidic acid signaling may initiate fetal hydrocephalus. *Science Translational Medicine*, 3(99). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002095>
185. Yung, Y. C., Stoddard, N. C., Mirendil, H., & Chun, J. (2015). Lysophosphatidic Acid Signaling in the Nervous System. *Neuron*, 85(4), 669–682. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.01.009>
186. Zhang, J., & Liu, Q. (2015). Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein and Cell*, 6(4), 254–264. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0131-3>
187. Zhang, T., Chen, D., & Lee, T. H. (2020). Phosphorylation signaling in APP processing in Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010209>
188. Zheng, W. H., Bastianetto, S., Mennicken, F., Ma, W., & Kar, S. (2002). Amyloid  $\beta$  peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience*, 115(1), 201–211. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(02\)00404-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(02)00404-9)
189. Zhou, L., Barão, S., Laga, M., Bockstael, K., Borgers, M., Gijzen, H., Annaert, W., Moechars, D., Mercken, M., Gevaer, K., & De Strooper, B. (2012). The neural cell adhesion molecules L1 and CHL1 are cleaved by BACE1 protease in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 25927–25940. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.377465>
190. Zhu, K., Xiang, X., Filser, S., Marinković, P., Dorostkar, M. M., Crux, S., Neumann,

U., Shimshek, D. R., Rammes, G., Haass, C., Lichtenthaler, S. F., Gunnensen, J. M., & Herms, J. (2018). Beta-Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 Inhibition Impairs Synaptic Plasticity via Seizure Protein 6. *Biological Psychiatry*, 83(5), 428–437. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.12.023>

## 8. ILUSTRACIJE

### Popis tablica

**Tablica 1.** Sastav reakcijske smjese za jedan uzorak za genotipizaciju miševa NPC1.

**Tablica 2.** Početnice korištene za genotipizaciju miševa NPC1.

**Tablica 3.** Uvjeti reakcije PCR (PCR program) za umnožavanje DNA za genotipizaciju miševa NPC1.

**Tablica 4.** Mediji za pripremu primarne kulture neurona i njihov sastav.

**Tablica 5.** Mediji za uzgoj organotipskih rezova mišjih mozgova i njihov sastav.

**Tablica 6.** Sastav otopina saharoze za ultracentrifugiranje u diskontinuiranom gradijentu gustoće.

**Tablica 7.** Sastav Tris-glicin poliakrilamid gelova za razdvajanje i sabijanje (10 ml) te pufera za elektroforezu.

**Tablica 8.** Sastav peptidnog Tris-tricin gela (volumen za dva 1.5 mm gela) te katodnog i anodnog pufera za elektroforezu.

**Tablica 9.** Popis korištenih antitijela i razrjeđenje za pojedinu metodu.

**Tablica 10.** Popis analiziranih lipidnih razreda.

### Popis slika

**Slika 1. Niemann-Pickova bolest tipa C pokazuje značajnu heterogenost s obzirom na dob javljanja bolesti i simptome.** Shematski prikaz različitih oblika bolesti NPC s naglaskom na vrstu i dob pojave prvih neuroloških simptoma. Heterogenost bolesti NPC doprinosi njenom otežanom i ranom prepoznavanju te njenoj nedovoljnoj dijagnosticiranosti (preuzeto i prilagođeno prema Patterson i sur., 2012).

**Slika 2. Transport kolesterola u stanici.** Kolesterol ulazi u stanicu endocitozom nakon što se lipoproteinska čestica LDL veže na LDL-receptor. Zatim se LDL čestica prenosi do ranih endosoma koji sazrijevaju do kasnih endosoma i lizosoma gdje se hidrolizira, a proteini NPC1 i NPC2 imaju ulogu u prijenosu neesterficiranog kolesterola i drugih lipida iz kasnih endosoma/lizosoma prema *trans*-Golgijevoj mreži, endoplazmatskom retikulumu i ostalim staničnim dijelovima. (preuzeto i prilagođeno po Pacheco i Lieberman, 2008).

**Slika 3. Nedostatak proteina NPC1 ili NPC2 uzrokuje nakupljanje kolesterola u kasnim endosomima i lizosomima.** Zbog nedostatka proteina NPC1 ili NPC2 dolazi do nakupljanja kolesterola i ostalih lipida u kasnim endosomima/lizosomima što uzrokuje smanjenu razinu kolesterola u staničnoj membrani i ostalim dijelovima

stanice poput *trans*-Golgijeve mreže i endoplazmatskog retikuluma (ER-a). Smanjena razina kolesterola u ER-u uzrokuje povećanu *de novo* sintezu kolesterola unutar stanice (preuzeto i prilagođeno po Pacheco i Lieberman, 2008).

**Slika 4.** Prikaz neuropatoloških obilježja AB: senilnih plakova- izvanstaničnih nakupina peptida A $\beta$  i neurofibrilarnih snopića - unutarstaničnih nakupina hiperfosforiliranog proteina tau (preuzeto i prilagođeno prema Burns, 2009).

**Slika 5. Shematski prikaz procesiranja prekursora proteina amiloid- $\beta$  (APP).** APP se može cijepati prvo  $\beta$ -sekretazom u amiloidogenom putu ili  $\alpha$ -sekretazom u neamiloidogenom putu. Kao rezultat cijepanja nastaju topljivi odsječci sAPP $\beta$  ili sAPP $\alpha$  te C-terminalni odsječci CTF $\beta$ /C99 ili CTF $\alpha$ /C83. C-terminalni odsječci CTF $\alpha$ /C83 ili CTF $\beta$ /C99 su supstrati  $\gamma$  sekretaze čijim cijepanjem nastaje AICD (engl. *APP Intracellular domain*) te amiloidogeni peptid amiloid- $\beta$  (A $\beta$ ) ili neamiloidogeni peptid p3 (preuzeto i prilagođeno prema Uddin i sur., 2020).

**Slika 6. Primarna struktura proenzima BACE1.** BACE1 je transmembranska asparaginska proteaza tipa 1 izgrađena od 501 aminokiseline. Sastoji se od pet domena: signalnog peptida, propeptida, katalitičke domene sa dva motiva (DTGS, DSGT) koji čine aktivno mjesto enzima, transmembranske i citosolne domene. BACE1 se sintetizira kao proenzim u ER nakon čega u Golgijevom aparatu dolazi do cijepanja njegove propeptidne domene i drugih posttranslacijskih modifikacija te nastaje aktivna proteaza BACE1 (preuzeto i prilagođeno prema Yan i Vassar, 2014).

**Slika 7. Supstrati proteaze BACE1 u mozgu.** Supstrati proteaze BACE1 navedeni su od onih koji se isključivo ili pretežno cijepaju proteazom BACE1 prema onima čije je cijepanje proteazom BACE1 nisko (lijevo). Navedeni supstrati se cijepaju i enzimima iz obitelji ADAM (od engl. *A Disintegrin And Metalloprotease*), ali je preferencija cijepanja suprotna onoj proteaze BACE1 (desno) (preuzeto i prilagođeno prema Yan i sur., 2014).

**Slika 8. Primarne kulture neurona mišjeg modela bolesti NPC pokazuje patološke karakteristike bolesti NPC.** A) Genotip miševa određen je metodom PCR - umnažanjem gena *NPC1*. Dobivene DNA vrpce su vizualizirane elektroforezom u agaroznom gelu. B) Razina proteina NPC1 provjerena je metodom Western blot. C) Imunocitokemijom i konfokalnom laserskom mikroskopijom analizirani su biljezi lizosoma-LAMP1 i aksona-TUJ1 te slobodni kolesterol (bojenje filipinom). D) Veličina LAMP1 pozitivnih vezikula u somi primarnih hipokampalnih neurona wt i NPC1 kvantificirana je u programu ImageJ. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD, n= 30 stanica po grupi iz 3 nezavisna pokusa. Statistička značajnost je izračunata *t*-testom, \*\*\* $p < 0,001$ . E) Analiza razine hiperfosforiliranog i ukupnog proteina tau metodom Western blot. F) Rezultati dobiveni metodom Western blot kvantificirani su programom ImageJ i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom. Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD. Statistička značajnost je izračunata *t*-testom, \* $p < 0,05$ .

**Slika 9. Proteoliza supstrata enzima BACE1 u primarnim kortikalnim neuronima miševa wt i NPC1.** Primarni kortikalni neuroni izolirani su iz mladunaca postanalnog dana 0-1 (P0-P1) i uzgajani u kulturi 14 dana. Nakon toga su pripremljeni stanični lizati i medij analizirani metodom Western blot. A-C) Razina proteina Sez6L, Sez6, APP u staničnom lizatu (flSez6L, flSez6, flAPP) i mediju (sSez6L, sSez6, sAPP) analizirana je metodom

Western blot koristeći specifična antitijela. D-F) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa kvantificirani su programom Image J (NIH, SAD) i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom, te su statistički obrađeni. Statistička značajnost izračunata je *t*-testom: \**p*<0,05. Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost ± SD.

**Slika 10. Razina proteina BACE1 je značajno povišena u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 u odnosu na miševe wt.** Primarni kortikalni neuroni su izolirani iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), uzgajani su u kulturi 14 dana. Pripremljeni stanični lizati analizirani su metodom Western blot. A) Razina proteina BACE1 analizirana je metodom Western blot koristeći specifična antitijela. B) Rezultati dobiveni metodom Western blot kvantificirani su programom Image J i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom, te su statistički obrađeni. Statistička značajnost izračunata je *t*-testom: \**p*<0,05. Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost ± SD.

**Slika 11. Hipokampalni neuroni miševa NPC1 pokazuju povećanu kolokalizaciju proteina Sez6L i Sez6 s vezikulama pozitivnim na bijeg ranih endosoma-EEA1.** Hipokampalni neuroni izolirani su iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), te su uzgajani u kulturi 14 dana. Neuroni su fiksirani i obilježeni specifičnim antitijelima A) za protein Sez6L i biljeg ranih endosoma EEA1, B) za protein Sez6 i biljeg ranih endosoma, EEA1. Bojanje filipinom je pokazalo nakupljanje slobodnog neesterificiranog kolesterola u somi neurona NPC1 u odnosu na neurona wt. Obilježeni neuroni su gledani konfokalnim laserskim mikroskopom.

**Slika 12. Inhibicija proteaze BACE1 u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 i wt blokira proteolizu supstrata Sez6L i Sez6.** Primarni kortikalni neuroni izolirani su iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2 μM, 48h). A) Razina proteina Sez6L, Sez6, APP u staničnom lizatu (flSez6L, flSez6, flAPP) i mediju (sSez6L, sSez6, sAPP) analizirana je metodom Western blot. B, C) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa kvantificirani su programom Image J i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom, te su statistički obrađeni. Statistička značajnost izračunata je statističkim testom ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom: \**p*<0,05. Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost ± SD.

**Slika 13. Utjecaj inhibicije proteaze BACE1 na razinu C-terminalnih odsječaka proteina APP u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1.** Primarni kortikalni neuroni izolirani su iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), uzgajani su u kulturi ukupno 14 dana. Dvanaesti dan u kulturi su tretirani inhibitorom C3 (2 μM, 48h). A) Razina C-terminalnih odsječaka proteina APP u staničnom lizatu analizirana je metodom Western blot. B) Rezultati dobiveni metodom Western blot kvantificirani su programom Image J (NIH, SAD) i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom, te su analizirani statističkim testom ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom \**p*<0,05. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± SD.

**Slika 14. Tretman inhibitorom proteaze BACE1 smanjuje kolokalizaciju proteina Sez6L i Sez6 s vezikulama pozitivnim na bijeg ranih endosoma-EEA1.** Hipokampalni neuroni izolirani su iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1) te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2μM). Nakon 48h hipokampalni neuroni su fiksirani i obilježeni specifičnim antitijelima A) za protein Sez6L i biljeg ranih endosoma EEA1, B) za protein Sez6 i biljeg ranih endosoma, EEA1. Obilježeni neuroni su gledani konfokalnim laserskim mikroskopom.



**Slika 15. Tretman inhibitorom proteaze BACE1 utječe na smještaj i morfologiju ranih endosoma u primarnim hipokampalnim neuronima miševa NPC1.** Hipokampalni neuroni izolirani su iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2 $\mu$ M). Nakon 48h hipokampalni neuroni su fiksirani i A) obilježeni specifičnim antitijelom za biljeg ranih endosoma EEA1. Obilježeni neuroni su gledani konfokalnim laserskim mikroskopom. B) Veličina EEA1 pozitivnih vezikula u somi i neuritima netretiranih i inhibitorom BACE1 tretiranih hipokampalnih neurona wt i NPC1 kvantificirana je u programu Image J. C) Broj EEA1 pozitivnih vezikula manjih od 0.5  $\mu$ m<sup>2</sup> i većih ili jednakih 0.5  $\mu$ m<sup>2</sup> u somi i neuritima netretiranih i inhibitorom BACE1 tretiranih hipokampalnih neurona wt i NPC1 kvantificiran je u programu Image J. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD, n= 30 stanica po grupi iz 3 nezavisna pokusa. Statistička značajnost izračunata je statističkim testom ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom: \*p<0,05, \*\*p<0,01.

**Slika 16. Tretman inhibitorom proteaze BACE1 ne utječe na smještaj i morfologiju lizosoma u primarnim hipokampalnim neuronima miševa NPC1.** Hipokampalni neuroni izolirani su iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2 $\mu$ M). Nakon 48h hipokampalni neuroni su fiksirani i A) obilježeni specifičnim antitijelom za biljeg lizosoma LAMP1. Obilježeni neuroni su gledani konfokalnim laserskim mikroskopom. B) Veličina LAMP1 pozitivnih vezikula u somi i neuritima netretiranih i inhibitorom BACE1 tretiranih hipokampalnih neurona wt i NPC1 kvantificirana je u programu Image J. Podatci su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD, n= 30 stanica po grupi iz 3 nezavisna pokusa. Statistička značajnost izračunata je statističkim testom ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

**Slika 17. Inhibicija proteaze BACE1 ne utječe na razine proteina endolizosomalnog puta u primarnim kortikalnim neuronima miševa NPC1 i wt.** Primarni kortikalni neuroni su izolirani iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1), te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2 $\mu$ M, 48h). A) Pripremljeni stanični lizati analizirani su metodom Western blot na proteine endolizosomalnog puta- EEA1 (biljeg ranih endosoma) i LAMP1 (biljeg lizosoma). B) Rezultati dobiveni metodom Western blot u tri neovisna pokusa kvantificirani su programom Image J i normalizirani prema ukupnoj razini proteina određenoj bojanjem Amidoblack bojom te analizirani statističkim testom ANOVA. Nije zabilježena statistička značajnost. Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

**Slika 18. Imunocitokemijska analiza hiperfosforiliranog i ukupnog proteina tau u primarnim hipokampalnim neuronima miševa NPC1 i wt tretiranim inhibitorom proteaze BACE1.** Imunocitokemijska analiza nije pokazala razlike u bojanju hiperfosforiliranog (PHF1) i ukupnog proteina tau (total tau) između neurona NPC1 i wt, kao ni razlike između netretiranih neurona i neurona tretiranih inhibitorom proteaze BACE1-C3 u miševima NPC1 i wt. Hipokampalni neuroni su izolirani iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1) te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2 $\mu$ M). Nakon 48h hipokampalni neuroni su fiksirani i obilježeni specifičnim antitijelima za proteine PHF1 i total tau. Obilježeni neuroni su gledani konfokalnim laserskim mikroskopom.

**Slika 19. Imunocitokemijska analiza hiperfosforiliranog i ukupnog proteina tau u primarnim hipokampalnim neuronima miševa NPC1 i wt tretiranim inhibitorom proteaze BACE1.** Imunocitokemijska analiza nije pokazala razlike u bojanju hiperfosforiliranog (PHF1) i ukupnog proteina tau (total tau) između neurona NPC1 i wt, kao ni razlike između netretiranih neurona i neurona tretiranih inhibitorom proteaze BACE1-

C3 u miševima NPC1 i wt. Hipokampalni neuroni su izolirani iz mladunaca postnatalnog dana 0-1 (P0-P1) te su dvanaesti dan u kulturi tretirani inhibitorom proteaze BACE1-C3 (2 $\mu$ M). Nakon 48h hipokampalni neuroni su fiksirani i obilježeni specifičnim antitijelima za proteine PHF1 i total tau. Obilježeni neuroni su gledani konfokalnim laserskim mikroskopom.

**Slika 20. Tretman inhibitorom proteaze BACE1 uzrokuje sniženje neuroinflamacije u kortiko-hipokampalnim rezovima mozga miševa NPC1.** Kortiko-hipokampalni rezovi su uzgajani u kulturi 21 dan nakon čega su tretirani inhibitorom proteaze BACE 1-C3 (2 $\mu$ M). Nakon 96 h rezovi mozga su fiksirani i obilježeni specifičnim antitijelima za biljeg astrocita- GFAP i biljeg aktiviranih mikroglija- CD68 i gledani konfokalnim laserskim mikroskopom. Prikazane su moždane regije A) kora velikog mozga i B) CA3 regija hipokampusa. C) Rezultati dobiveni imunohistokemijskom analizom CD68 pozitivnih stanica kvantificirani su u programu Image J. Statistička značajnost izračunata je statističkim testom ANOVA s Tukey's *post hoc* analizom: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Podatci iz tri nezavisna pokusa prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

**Slika 21. Prikaz karakterističnih prstenova dobivenih frakcioniranjem endolizosoma metodom ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu saharoze.** Moždane regije hipokampusa i malog mozga miševa wt i NPC1 su homogenizirane, a dobiveni PNS je razdvojen u diskontinuiranom gradijentu saharoze (8%, 25%, 35% i 40,6%-tne otopine saharoze). Prstenovi predstavljaju nakupljanje pojedinih organela koje su iste gustoća kao gustoća pojedine međufaze između otopina saharoze: 1. prsten između 8%-tne i 25%-tne otopine saharoze- kasni endosomi/lizosomi, 2. prsten između 25%-tne i 35%-tne otopine saharoze- rani endosomi, 3. prsten između 35%-tne i 40,6%-tne otopine saharoze- teška frakcija koja sadrži organele endoplazmatskog retikuluma i Golgijevog aparata.

**Slika 22. Slobodni kolesterol se nakuplja u frakcijama kasnih endosoma/lizosoma u malog mozga i hipokampusu 4 tjedna starih miševa wt i NPC1.** U frakciji kasnih endosoma/lizosoma (LE, 1. prsten), ranih endosoma (EE, 2. prsten) i teškoj frakciji (HF, 3. prsten) izmjerena je koncentracija slobodnog kolesterola komercijalno dostupnim kompletom Amplex Red Cholesterol Assay te je izražena kao omjer koncentracije slobodnog kolesterola i koncentracije proteina u frakcijama. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  SD.

**Slika 23. Raspodjela i razina biljega endolizosomalnog puta promijenjena je u endolizosomskim frakcijama malog mozga 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt.** Nakon ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze dvanaest frakcija (po 1 ml) sakupljeno je s vrha gradijenta i analizirano metodom Western blot. Frakcije su označene brojevima od 1-12. Frakcije 1 i 2 predstavljaju frakcije kasnih endosoma/lizosoma (1. prsten), frakcije 4 i 5-rane endosome (2. prsten) i frakcija 9-tešku frakciju (3. prsten). A) Metodom Western blot analizirani su proteinski biljezi kasnih endosoma (Rab7), lizosoma (LAMP1) i ranih endosoma (EEA1). B) Grafički prikazi kvantificiranih proteinskih signala Rab7, LAMP1 i EEA1 u svakoj frakciji između miševa wt i NPC1, dobiveni kvantificiranjem signala programom Image J.

**Slika 24. Raspodjela i razina supstrata BACE1 u endolizosomskim frakcijama malog mozga 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt.** Nakon ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze dvanaest frakcija (po 1 ml) sakupljeno je s vrha gradijenta i analizirano metodom Western blot. Frakcije su označene brojevima od 1-12. Frakcije 1 i 2 predstavljaju frakcije kasnih endosoma/lizosoma (1. prsten), frakcije 4 i 5-rane endosome (2. prsten) i frakcija 9-tešku frakciju (3. prsten). A) Metodom Western blot analizirani su

supstrati BACE1- proteini Sez6L, Sez6, APP te proteaza BACE1. B) Grafički prikazi kvantificiranih proteinskih signala Sez6L, Sez6, APP i BACE1 u svakoj frakciji između miševa wt i NPC1, dobiveni kvantificiranjem signala programom Image J.

**Slika 25. Raspodjela i razina biljega endolizosomalnog puta promijenjena je u endolizosomskim frakcijama hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt.** Nakon ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze dvanaest frakcija (po 1 ml) sakupljeno je s vrha gradijenta i analizirano metodom Western blot. Frakcije su označene brojevima od 1-12. Frakcije 1 i 2 predstavljaju frakcije kasnih endosoma/lizosoma (1. prsten), frakcije 4 i 5-rane endosome (2. prsten) i frakcija 9-tešku frakciju (3. prsten). A) Metodom Western blot analizirani su proteinski biljezi kasnih endosoma (Rab7), lizosoma (LAMP1) i ranih endosoma (EEA1). B) Grafički prikazi kvantificiranih proteinskih signala Rab7, LAMP1 i EEA1 u svakoj frakciji između miševa wt i NPC1, dobiveni kvantificiranjem signala programom Image J.

**Slika 26. Raspodjela i razina supstrata BACE1 u endolizosomskim frakcijama hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 u odnosu na wt.** Nakon ultracentrifugiranja u diskontinuiranom gradijentu gustoće saharoze dvanaest frakcija (po 1 ml) sakupljeno je s vrha gradijenta i analizirano metodom Western blot. Frakcije su označene brojevima od 1-12. Frakcije 1 i 2 predstavljaju frakcije kasnih endosoma/lizosoma (1. prsten), frakcije 4 i 5-rane endosome (2. prsten) i frakcija 9-tešku frakciju (3. prsten). A) Metodom Western blot analizirani su supstrati enzima BACE1- proteini Sez6L, Sez6, APP i proteaza BACE1. B) Grafički prikazi kvantificiranih proteinskih signala Sez6L, Sez6, APP i BACE1 između miševa wt i NPC1, dobiveni kvantificiranjem signala programom Image J.

**Slika 27. Ukupna količina lipida u malom mozgu i hipokampusa 4 tjedna starih miševa wt i NPC1.** Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri biološka replikata  $\pm$  SD. Dobivene vrijednosti analizirane su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom i nisu uočene statistički značajne razlike.

**Slika 28. Lipidni sastav malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt.** Količina pojedinog lipidnog razreda je normalizirana na ukupnu količinu lipida u pripadajućem uzorku i izražena je kao postotak lipida u uzorku. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri biološka replikata  $\pm$  SD.

**Slika 29. Analiza lipidnih razreda u malom mozgu i hipokampusu 4 tjedna starih miševa wt i NPC1.** Analizirani lipidni razredi su prikazani po kategorijama A) fosfolipidi, B) glicerolipidi, C) sfingolipidi. Lipidni razred je naveden iznad svakog grafa. Količina pojedinog lipidnog razreda je normalizirana na ukupnu količinu lipida u pripadajućem uzorku i izražena je kao postotak lipida u uzorku. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost tri biološka replikata  $\pm$  SD. Dobivene vrijednosti analizirane su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom a Dunn's *post hoc* testom su utvrđene statistički značajne razlike, \* $p < 0,05$ .

**Slika 30. Ukupna količina lipida u frakciji ranih endosoma malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa wt i NPC1.** Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dva biološka replikata  $\pm$  SD. Dobivene vrijednosti analizirane su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom i nisu uočene statistički značajne razlike.

**Slika 31. Lipidni sastav frakcija ranih endosoma malog mozga i hipokampusa 4 tjedna starih miševa NPC1 i wt.** Količina pojedinog lipidnog razreda je normalizirana na ukupnu količinu lipida u pripadajućem uzorku i izražena je kao postotak lipida u uzorku. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dva biološka replikata  $\pm$  SD.

**Slika 32. Analiza lipidnih razreda u frakcijama ranih endosoma malog mozga i hipokampusu 4 tjedna starih miševa wt i NPC1.** Analizirani lipidni razredi su prikazani po kategorijama A) fosfolipidi, B) glicerolipidi, C) sfingolipidi. Lipidni razred je naveden iznad svakog grafa. Količina pojedinog lipidnog razreda je normalizirana prema ukupnoj količini lipida u pripadajućem uzorku i izražena je kao postotak lipida u uzorku. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost dva biološka replikata  $\pm$  SD. Dobivene vrijednosti analizirane su neparametrijskim Kruskal-Wallis testom i nisu uočene statistički značajne razlike.

## 9. ŽIVOTOPIS

Ana Rastija je rođena 2. studenog 1993. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu i srednju školu. 2012. godine maturirala je u XV. Matematičkoj gimnaziji u Zagrebu, te upisala studij molekularne biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad je izradila na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za eksperimentalnu terapiju. Diplomirala je na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2017. godine i stekla titulu magistre molekularne biologije (prosjeck ocjena 4,959). Tijekom studiranja dobitnica je stipendije grada Zagreba za izvrsnost studenata. Od 2018. je zaposlena kao asistent u Laboratoriju za istraživanje neurodegenerativnih bolesti Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu Ruđer Bošković. Svoju doktorsku disertaciju izradila je pod mentorstvom dr.sc. Silve Katušić Hećimović. Tijekom zaposlenja bila je istraživač na dva projekta i otišla na usavršavanje u *Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM)*, Pariz, Francuska. Aktivno je sudjelovala na 5 međunarodnih kongresa te položila LabAnim tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama (B kategorija). Dobitnica je kratkoročne stipendije Francuskog Veleposlanstva u Republici Hrvatskoj i Instituta Ruđer Bošković, te nagrade za najbolju prezentaciju na Danima doktoranada Medicinske kemije (2021). Publicirala je dva znanstvena rada, jedan kao prvi autor i jedan kao drugi autor. Članica je nekoliko međunarodnih i domaćih znanstvenih organizacija.